

**Verhalten, Morphologie und Physiologie
von *Paramecium biaurelia*
und *Tetrahymena pyriformis*
unter variablen Umweltbedingungen**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)

der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der

Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von

Nicole Freiburger

aus

Eschweiler

Bonn 2004

Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1. Referent: Prof. Dr. Dieter Volkmann
2. Referentin: PD Dr. Ruth Hemmersbach

Tag der Promotion: 15.12.2004

1.	Einleitung	6
1.1.	Ciliaten als Modellsysteme: <i>Paramecium</i> und <i>Tetrahymena</i>	7
1.2.	Theoretische Modelle zur Wahrnehmung von Beschleunigungen.....	8
1.2.1.	Einfluss von Beschleunigung auf das Schwimmverhalten von Ciliaten.....	14
1.3.	Temperatur als Störreiz	15
1.3.1.	Morphologische Veränderungen unter dem Einfluss von Temperaturveränderungen.	17
1.3.2.	Einfluss der Kultivierungstemperatur auf das Schwimmverhalten von Ciliaten	18
1.4.	Weitere physiologische und biochemische Gesichtspunkte der Reizperzeption von Einzellern	20
1.5.	Ziele der Arbeit	21
2.	Material und Methoden	22
2.1.	Organismen und Kulturen	22
2.1.1.	Kultivierung von <i>Paramecium biaurelia</i>	22
2.1.2.	Kultivierung von <i>Tetrahymena pyriformis</i>	23
2.2.	Untersuchungen zum Einfluss der Kultivierungstemperatur.....	25
2.2.1.	Viskositätsmessung	25
2.2.2.	Beeinflussung des Schwimmverhaltens	26
2.2.2.1.	Versuchsaufbau (Geräte und Messkammern)	26
2.2.2.2.	Computerunterstützte Bildverarbeitung	27
2.2.2.3.	Zeitschemata der Versuche	28
2.2.2.4.	Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit und der gravimetrischen Komponente	28
2.2.3.	Untersuchungen zur Zellmorphologie	29
2.2.3.1.	Dichtezentrifugation	29
2.2.3.2.	Bestimmung der Formfaktoren (Zellfläche, Achsenverhältnisse)	30
2.2.3.3.	Mikroskopische Untersuchung der fixierten Einzeller: Elektronenmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie (Konfokales Laser-Scanning)	31
2.2.4.	Nachweis von Indolaminen	33
2.2.4.1.	Darstellung von Indolaminen mit Hilfe der HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)	34
2.2.4.2.	Beschreibung der HPLC-Apparatur	35
2.2.4.3.	Kalibrierung und Auswertung	36
2.3.	Bestimmung der Second-Messenger-Konzentrationen	37
2.3.1.	Zentrifugationsversuche.....	37
2.3.2.	Versuche unter Mikrogravitation auf einer Höhenforschungsrakete (TEXUS 39)	38
2.3.3.	cAMP-Bestimmung	41
2.3.4.	cGMP-Bestimmung	42
2.3.5.	Proteinbestimmung	43
2.4.	Statistische Methoden.....	43
2.4.1.	Auswertung des Schwimmverhaltens	43
2.4.2.	Auswertung der morphologischen Untersuchungen	44
2.4.3.	Auswertung der Second-Messenger-Bestimmungen.....	45

3.	Ergebnisse.....	46
3.1.	Verhaltensänderungen während der Langzeitkultivierung der Einzeller in niedriger Temperatur	46
3.2.	Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen	46
3.2.1.	Gravitaxis und Gravikinese von <i>Tetrahymena</i>	46
3.2.1.1.	Schwimmgeschwindigkeiten von <i>Tetrahymena</i> unter Temperatureinwirkung	48
3.2.2.	Reversalraten von <i>Paramecium</i> und <i>Tetrahymena</i>	50
3.2.3.	Viskosität der Kulturmedien.....	52
3.3.	Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen der Kältekulturen von <i>Paramecium</i> und <i>Tetrahymena</i>.....	55
3.3.1.	Elektronenmikroskopische Darstellung der Ciliaten	55
3.3.2.	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Neutrallipide bei Ciliaten	56
3.3.3.	Darstellung der Formfaktoren Zellfläche und Achsenverhältnis der Ciliaten	62
3.4.	Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen	68
3.4.1.	Einfluss der Kultivierungstemperatur und -dauer auf die 5`Methoxy-Tryptamin- und Melatoninkonzentrationen der Ciliaten.....	68
3.5.	Einfluss von Beschleunigungen auf den Gehalt an sekundären Botenstoffe von Ciliaten	72
3.5.1.	Einfluss erhöhter Beschleunigungen auf den cAMP-Gehalt von <i>Tetrahymena</i>	72
3.5.2.	Einfluss von Mikrogravitation auf den Gehalt an sekundären Botenstoffen in <i>Tetrahymena</i> und <i>Paramecium</i>	75
3.5.2.1.	cAMP-Konzentration bei <i>Tetrahymena</i>	75
3.5.2.2.	cGMP-Konzentrationen bei <i>Tetrahymena</i> und <i>Paramecium</i>	76
4.	Diskussion	78
4.1.	Verhaltensänderungen durch Temperatureinfluss	78
4.1.1.	Gravikinese unter Temperatureinfluss	78
4.1.2.	Reversalrate unter Temperatureinfluss.....	80
4.2.	Zellmorphologie als Ursache von Verhaltensänderungen	82
4.3.	Indolaminkonzentration als Indikator für temperaturabhängige Anpassungen des Stoffwechsels.....	89
4.3.1.	Melatonin und 5`Methoxy-Tryptamin	90
4.4.	Auswirkungen von Beschleunigungen auf die Second Messenger-Konzentrationen von <i>Tetrahymena</i>	91
4.4.1.	Hypergravitation	92
4.4.2.	Mikrogravitation	93
5.	Zusammenfassung	96
6.	Literaturverzeichnis	99

Abkürzungen

Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

Danksagung

Lebenslauf

1. Einleitung

Organismen nehmen die Reize ihrer Umwelt auf vielfältige Weise wahr. Besonders interessante Umweltreize sind Temperatur und Beschleunigung, da es sich dabei um Umweltfaktoren handelt, denen die Ciliaten ständig ausgesetzt sind. Die Temperatur ist in der natürlichen Umgebung einem steten Wandel unterworfen. Die Schwerkraft ist dagegen als Reiz immer konstant und wirkt im Allgemeinen in der natürlichen Umgebung als ständiger Reiz auf frei schwimmende Zellen wie die untersuchten Einzeller ein. Die Organismen müssen daher Strategien entwickelt haben, mit den Bedingungen ihrer Umwelt umzugehen und diese sogar für sich zu nutzen.

Ciliaten, insbesondere *Paramecium* und *Tetrahymena*, sind in diesem Zusammenhang schon seit längerer Zeit Forschungsobjekte zur Aufklärung von Perzeptionsmechanismen (Czapeck, 1895; Pickard & Thimann, 1966; Kuroda & Kamiya, 1989; Taneda et al., 1987; Baba et al., 1991; Machemer et al., 1993). Das Schwimmverhalten der Einzeller ist gut untersucht. Über die Mechanismen, die hinter diesem Verhalten stehen, ist dagegen weniger bekannt. Die verschiedenartigen Untersuchungen im Verlauf dieser Dissertation sollen zum Verständnis beitragen, in welcher Weise Strukturen und Mechanismen einer Zelle zur Verarbeitung von Umweltreizen beitragen können und wie im Speziellen die Reize Temperatur und Beschleunigung verarbeitet werden.

Der besondere Vorteil von Ciliaten wie *Paramecium* und *Tetrahymena* zur näheren Untersuchung möglicher Signaltransduktionsketten bzw. ihrer einzelnen Teilkomponenten und deren Wechselwirkung ist, dass die gesamte Verarbeitung des Reizes in einer einzelnen Zelle abläuft (Pech, 1995). *Paramecium* wurde aus diesem Grund von verschiedenen Autoren auch als „schwimmende Nervenzelle“ bezeichnet (Machemer & de Peyer, 1977; Naitoh, 1984).

1.1. Ciliaten als Modellsysteme: *Paramecium* und *Tetrahymena*

Die natürliche Umgebung von Einzellern bietet diesen verschiedenste Reize als Informationsquelle, z.B. über ihre Lage in Bezug zur Umwelt: physikalische Reize wie Temperatur, Licht und Beschleunigung, chemische, z.B. pH-Wert, Ionen- und Sauerstoffkonzentration sowie biologische, z.B. Nahrungsangebot und Fressfeinde. Durch Wahrnehmung und Verarbeitung dieser Reize sind Einzeller, wie die hier untersuchten Ciliaten *Paramecium biaurelia* und *Tetrahymena pyriformis*, in der Lage, komplexe Verhaltensreaktionen zu zeigen.

Dabei sind Taxien als aktiv gesteuerte Richtungsbewegungen von besonderer Bedeutung. Verschiedenste Taxien sind bekannt und gut untersucht. Beispielsweise dient die Chemotaxis dem Erkennen von Nahrung durch Signalstoffe und aktives Steuern der Bewegung in Richtung Nahrungsquelle. Die Phototaxis kann der Ausrichtung zum Licht hin oder vom Licht weg dienen, je nach den Bedürfnissen des Einzellers. Durch die Wahrnehmung von Temperaturgradienten kann auch die Umgebungstemperatur zur Orientierung im umgebenden Medium genutzt werden.

Gravitaxis und Gravikinese sind Beispiele einer gesteuerten räumlichen Orientierung auf der Grundlage eines Beschleunigungsreizes. Es handelt sich um die von den untersuchten Ciliaten ausgebildeten Schwerkraftantworten. Die Gravitaxis ist eine gerichtete, durch den Schwerkraftvektor bestimmte, freie Bewegung im Raum. Unter der Gravikinese versteht man dagegen die Regulation der Schwimmgeschwindigkeit in Bezug auf die Richtung des Gravitationsvektors. Insofern weicht die Gravikinese von der üblichen Definition einer Kinese ab, bei der die Richtung des auslösenden Reizes keine Rolle spielt (Diehn et al., 1977). Man kann die Gravikinese auch als einen aktiven Ausgleich der Sedimentation verstehen, bei dem die Einzeller ihrem passiven Absinken durch Variation ihrer Geschwindigkeit entgegenwirken.

Die untersuchten Einzeller *Paramecium* und *Tetrahymena* zeigen im Allgemeinen eine deutlich ausgeprägte, der Richtung des Schwerkraftvektors entgegengesetzte

(= negative) Gravitaxis und eine Gravikinese (Jennings, 1906; Hemmersbach-Krause & Häder, 1990; Machemer & Bräucker, 1992; Winet & Jahn, 1974; Kowalewski et al., 1998; Hemmersbach et al., 1999). Beide Schwerkraftantworten resultieren bei den beiden untersuchten Ciliaten im gerichteten Aufwärtsschwimmen der Zellen (Machemer et al., 1991; Gebauer et al., 1999).

Die vorliegende Arbeit untersucht unter anderem die Graviperzeption als Beispiel für einen Reiz-Reaktions-Mechanismus, der vollständig in der einzelnen Zelle abläuft. Reize können in der Zelle neben passiven, physikalisch getriggerten Reaktionen auch komplexe physiologische Signaltransduktionsketten auslösen. Ausgangspunkt solcher Transduktionsketten ist die Perzeption des Reizes durch geeignete Strukturen, die an Membranen assoziiert oder auch innerhalb der Zelle lokalisiert sein können (s. 1.2.). An der Weiterleitung können dann Verstärkermechanismen biochemischer oder morphologischer Natur beteiligt sein. Über das genaue Zusammenspiel und die exakte Abfolge der Einzelkomponenten bei der Graviperzeption ist bisher jedoch nur wenig bekannt (Beschreibung des Modells, s. 1.2.).

Die den Untersuchungen zugrundeliegende Annahme ist, dass Manipulationen an einer Stelle der Reaktionskette helfen könnten, die nachfolgenden Schritte zu erkennen und aufzuklären. Wird beispielsweise die Perzeption des Schwerkraftreizes behindert, könnte der Vergleich mit einer normal perzipierenden Zelle zeigen, welche nachfolgenden Reaktionen ausbleiben. Damit ließe sich dann eventuell auch eine Aussage darüber machen, ob die auftretende Reaktion eher durch physikalische oder physiologische Hypothesen, wie sie im Folgenden beschrieben werden, oder eine Kombination aus beiden erklärt werden kann.

1.2. Theoretische Modelle zur Wahrnehmung von Beschleunigungen

Beschleunigungen, wie auch die Schwerkraft, wirken als mechanische Reize auf die Einzeller ein. Diese sind in der Lage, darauf mit gerichtetem Schwimmverhalten zu reagieren und dabei eine Raumorientierung auszuprägen.

Das Schwimmverhalten der Zellen und dessen Regulation sind der Schlüssel zum Verständnis der Gravisensitivität der Ciliaten.

Bei den unterschiedlichen Ansätzen, die „Wahrnehmung“ von Beschleunigungen bei Einzellern zu erklären, handelt es sich einmal um *physikalische Modelle* der Reizperzeption und -umsetzung, die eine Ausrichtung der Einzeller allein aufgrund der Zellform (Bojen-Prinzip) und anderer mechanischer Eigenschaften der Zellen erlauben (Dembowski, 1929a, b; Brinkmann, 1968; Fukui & Asai, 1985): „Mechanische Theorie“ (Dembowski, 1929a, b, 1931; Brinkmann, 1968); „Hydrodynamische Theorie“ (Roberts, 1970); „Antriebsabhängige Theorie“ (Winet & Jahn, 1974, Ooya et al., 1992); „Auftriebskrafttheorie“ (Nowakowska & Grebecki, 1977). Letztendlich werden für einen passiven Mechanismus die Masse der Zelle, der Zellschwerpunkt sowie das Drehmoment aufgrund des Zusammenspiels dieser Faktoren mit der Bewegung der Zelle diskutiert. Eine Zelle stellt sich durch ihre Form und/oder ihre mehr oder weniger ungleiche Dichteverteilung im Inneren bereits als „Boje“ dar, die bevorzugt mit einem Zellende voran sedimentiert. Bei der Bewegung der schwimmenden Zelle würde durch die Schwerkraft ein Drehmoment erzeugt, das eine Ausrichtung in eine bevorzugte Schwimmrichtung induziert.

Im Gegensatz dazu steht ein *physiologisches Modell* der Schwerkraftwahrnehmung, das verschiedene Stufen umfasst:

- Reizperzeption
- Verarbeitung des Reizes z.B. durch Umsetzung biochemischer und/oder bioelektrischer Signale
- Ausprägung des gravisensitiven Verhaltens.

Während die Gravikinese als rein physiologischer Prozess gesehen werden muss, da eine Regulation der Schwimmgeschwindigkeit immer mit einer aktiven Veränderung der Schlagfrequenz der Cilien einhergeht, scheint bei der Gravitaxis ein Zusammenspiel von physikalischen und physiologischen Faktoren möglich zu sein. Eine rein physikalische Ursache des gravitaktischen Verhaltens würde die Ergebnisse, die bei früheren Untersuchungen zur Abhängigkeit der

Schwerkraftantworten von der Temperatur erzielt wurden (s. 1.3.2.), nicht ausreichend erklären (Freiberger, 1997).

Der zeitliche Ablauf einer physiologischen Reizperzeption, bzw. die einzelnen Reaktionsschritte, sind noch nicht geklärt. Im Folgenden wird ein mögliches physiologisches Modell (Statocystenmodell) zur Reizperzeption bei Einzellern beschrieben (Abb. 1).

Eine geeignete Zellstruktur für eine physiologische Schwerkraftwahrnehmung ist die Zellmembran mit eingelagerten mechanosensitiven Ionenkanälen. Aber auch Strukturen innerhalb der Zelle können an einer physiologischen Reizperzeption beteiligt sein. Beispiele dafür sind die Müllerschen Körperchen bei *Loxodes* (Penard, 1917; Rieder, 1977; Fenchel & Finlay, 1984; Hemmersbach-Krause, 1988) sowie die Statolithen in pflanzlichen Zellen (Volkmann et. al., 1991; Sievers et. al., 1991, 1995; Baluska et al., 1997). Bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Ciliaten wird eine Perzeption über die Zellmembran und damit über Ionenkanäle angenommen.

Eine Möglichkeit zur Manipulation innerhalb einer physiologischen Signalkette, um Weiteres über den Ablauf der Reaktion zu erfahren, ist die Blockierung von Ionenkanälen, wie sie bei den Ciliaten für die Perzeption von Reizen allgemein genutzt werden (Naitoh, 1984; Machemer, 1988; Preston & Saimi, 1990). Die Untersuchung von Mutanten bietet Möglichkeiten, um „Kanalarten“ und deren Beteiligung an verschiedenen Reaktionen zu erkennen. Über die Untersuchung von Mutanten konnte zum Beispiel die spezifische Beteiligung der Ionenkanäle an unterschiedlichen Reaktionen im Schwimmverhalten nachgewiesen werden (Ramanathan et al., 1988; Van Houten & Preston, 1988).

Es konnte bisher jedoch kein spezieller mechanosensitiver Ionenkanal für die Perzeption der Schwerkraft gefunden werden. Durch elektrophysiologische Untersuchungen konnte in der Zellmembran der untersuchten Ciliaten aber die sehr spezifische Verteilung mechanosensitiver Calcium- und Kalium-Ionenkanäle

nachgewiesen werden, die für den hier postulierten Ablauf der Graviperzeption aufgrund ihrer bipolaren Anordnung geeignet sind (Abb. 1).

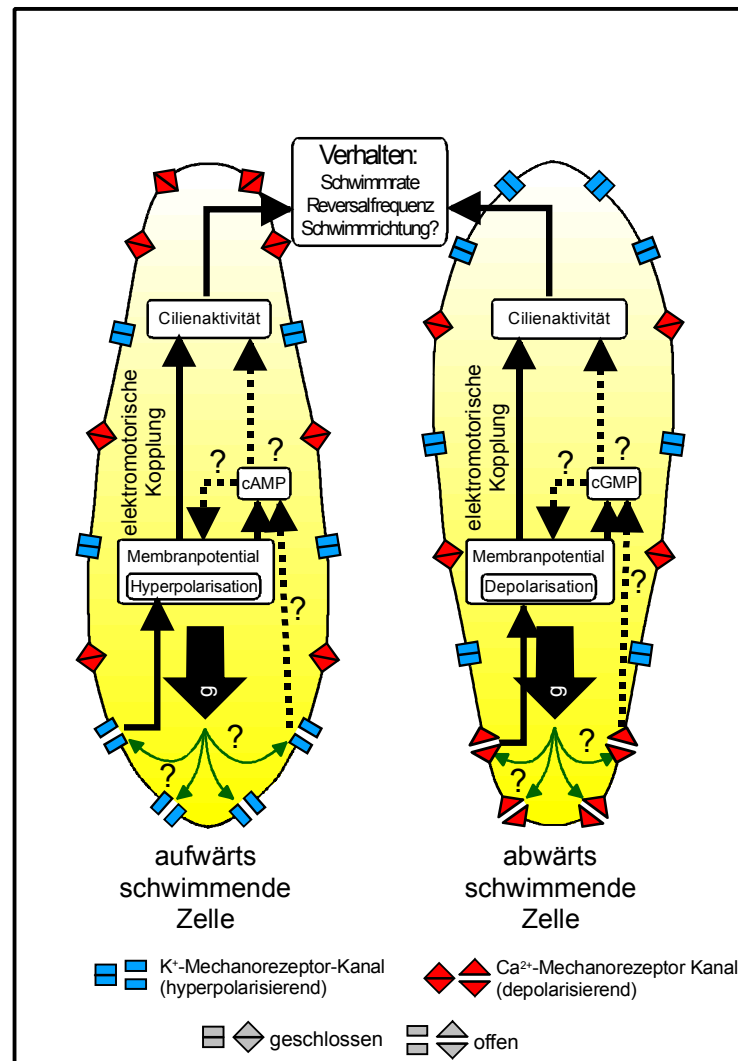


Abb. 1: Statocystenmodell der Graviperzeption bei *Paramecium*: Eine Aufwärtsorientierung (links) induziert das Öffnen mechanosensitiver Kalium-Kanäle. Die daraus resultierende Hyperpolarisation erhöht die Frequenz des Cilienschlags und dadurch die Fortbewegungsgeschwindigkeit der Zelle. Bei einer sich abwärts bewegenden Zelle (rechts) führt das Öffnen von mechanosensitiven Calcium-Kanälen und die damit einhergehende Depolarisation zur Verlangsamung der Zelle. Eine Beteiligung der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP an der Signalkette wird diskutiert. (Darstellung nach: R. Bräucker, R. Hemmersbach, 2002) g = Gravitationsvektor

So finden sich am anterioren Ende vermehrt mechanosensitive Ca²⁺-Kanäle, am posterioren Ende mechanosensitive K⁺-Kanäle (Machemer, 1988). Eine Stimulation dieser Kanäle führt so, je nach Lage der Zelle zur Reizquelle (hier die Schwerkraft), dazu, dass die depolarisierenden Ca²⁺- oder die hyperpolarisierenden K⁺-Kanäle geöffnet und in Folge die Schwimmgeschwindigkeiten modifiziert werden (Machemer et al., 1991). Eine

Depolarisation durch Reizung des anterioren Pols der Zelle führt zunächst zu einer Verlangsamung des Cilienschlags, bei weiterer Depolarisation zum Schwimmstopp und schließlich zum zeitweiligen schnellen Rückwärtsschwimmen. Eine Hyperpolarisation durch eine Reizung der K^+ -Kanäle führt zu einer schnelleren und geradlinigeren Fortbewegung der Zelle. Die Veränderung der Kanalaktivität durch die Verknüpfung mit Ca^{2+} -sensitiven Cytoskelettelementen könnte weiterhin zur sensibleren Steuerung der Schwerkraftperzeption dienen (Machemer-Röhnisch et al., 1996). Außerdem spielt Ca^{2+} auch bei der Modulation des Cilienschlags eine wichtige Rolle, wie unten weiter erläutert wird.

Die Modulation von Reizen kann Auskunft über die zur Auslösung eines Verhaltens notwendigen Reizstärken geben; ein Beispiel hierfür ist die Schwellenwertmessung für gravitaktisches Verhalten (Hemmersbach et al., 1996a).

Auch wird eine Beteiligung der sekundären Botenstoffe cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat) und cGMP (zyklisches Guanosin-Monophosphat) an der Übertragung des Reizsignals bei der Schwerkraftwahrnehmung diskutiert. Andererseits wäre auch eine Steuerung des Cilienschlags direkt über das Membranpotential denkbar.

Nach der oben beschriebenen Theorie zur physiologischen Reizverarbeitung in der Zelle ergibt sich die Frage nach der Abfolge der Teilschritte der Perzeption und Transduktion des Reizes. Dabei sind zwei Zeitfolgen des Ablaufs denkbar: zum Einen die Öffnung der Ionenkanäle über den Druck des Cytoplasmas auf die untere Zellmembran und dadurch eine nachfolgende Induzierung von Ionenströmen, die die weiterführende Signalkaskade einleiten, zum Anderen eine direkte elektromotorische Kopplung des Cilienschlags durch das Membranpotential mit einem anschließenden biochemischen Signal.

Im ersten Fall induziert die Öffnung der Ionenkanäle Ionenströme, die das Membranpotential ändern und die weitere Signalkaskade über biochemische Kopplung in Gang setzen, was letztlich zu einer Änderung des Schwimmverhaltens führt. Dabei wird sekundären Botenstoffen, wie Ca^{2+} , cAMP und cGMP, bei der

Vermittlung und Umsetzung des Signals eine wichtige Rolle zugeschrieben (Majima et al., 1986; Schultz et al., 1986; Bonini et al., 1986, 1991). Im Fall der elektromotorischen Kopplung des Cilienschlags treten die biochemischen Prozesse erst in der weiteren Folge der Signaltransduktion auf (Machemer, 1974). Von zentraler Bedeutung sind dabei intraciliär gelagerte Ca^{2+} -Ionen. Zellen (*Paramecium*), deren Membranen ein Ruhepotential aufweisen, bewegen sich mit konstanter Geschwindigkeit auf einer einmal eingeschlagenen Bahn. Der Ionengradient zwischen Zelle und Außenmedium wird dabei aufrecht erhalten (Elwess & Van Houten, 1997). Kommt es durch äußere Reize zur De- oder Hyperpolarisation der Zelle, z.B. durch Mechanostimulation oder chemische Reize (Naitoh & Eckert, 1968; Eckert, 1972), reagieren die Zellen mit verändertem Schwimmverhalten. In unregelmäßigen Abständen erfolgen außerdem spontane Richtungsänderungen (Reversals). Diese führen zu einer zufälligen Reorientierung der Zelle. Veränderungen der Botenstoffe würden bei dieser Abfolge der Reizperzeption erst in der Nachfolge auftreten. Die Reversalrate spiegelt den Einfluss der Kälte auf die Rate der spontanen Depolarisationen wider und spielt somit bei den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit eine wichtige Rolle. Eine ausreichend starke Änderung dieser Frequenz wäre in der Lage, eine gerichtete, durch eine Reizreaktion ausgelöste Membranpotentialänderung zu verdecken, so dass gravitaktisches Verhalten nicht mehr zum Tragen käme. Ob dies eine Erklärung für fehlende Gravitaxis bei Kälte sein könnte, soll in der vorliegenden Arbeit untersucht und diskutiert werden.

In *Paramecium* sowie in *Tetrahymena* (Csaba et al. 1976, 1978; Muto et al., 1985; Nandini-Kishore & Thompson, 1979) wurden sowohl cAMP als auch cGMP in relevanten, d.h. für biochemische Reaktionen ausreichend hohen Konzentrationen gefunden. Dies könnte unter anderem auf einen ähnlichen Mechanismus der Reizperzeption beider Zellen hinweisen, wenn cAMP als Botenstoff an der Reizverarbeitung beteiligt sein sollte. In *Paramecium* konnten zudem Adenylat- und Guanylat-Cyclase in den ciliären Membranen nachgewiesen werden (Schultz & Klumpp, 1984; Schultz et al., 1992).

Eine erhöhte cAMP-Konzentration wird mit der Hyperpolarisation der Membranen in Verbindung gebracht (Bonini et al., 1986; Schultz & Klumpp, 1988; Schultz & Schönborn, 1994), während cGMP in Zusammenhang mit der Depolarisation gesehen wird (Schultz et al., 1986; Majima et al., 1986). Für die cyclischen Nucleotide (cAMP / cGMP) wird so eine Beteiligung an der Feinregulierung des Cilienschlags diskutiert (Schultz et al. 1986, Bonini et al., 1986, 1991). An *Paramecium*-Zellmodellen (permeabilisierten Zellen) konnte z.B. gezeigt werden, dass cAMP und cGMP auf unterschiedliche Phasen des Cilienschlags wirken. Es wurde eine dosisabhängige, reversible Änderung der Schwimmgeschwindigkeit durch cAMP und cGMP gefunden (Nakaoka & Ooi, 1985; Bonini et al., 1986; Bonini & Nelson, 1988). Die Schwimmgeschwindigkeit wird dabei dadurch erhöht, dass zum Einen der Effektivschlag verstärkt (schneller) und zum Anderen die Cilien bei der Rückholung näher am Zellkörper geführt werden (Okamoto & Nakaoka, 1994).

Ein anderes System, das für die Steuerung des Schließmechanismus von Kanälen in der Zellmembran bei *Paramecium* (Machemer-Röhnisch et al., 1996), wie auch bei Pflanzenzellen (Volkman & Sievers, 1992; Volkman & Baluska, 2000) postuliert wird, ist ein Ca^{2+} -sensitives Filamentsystem. Hypothetisch könnten Filamente die Öffnung der mechanosensitiven Ionenkanäle steuern und regulieren. So könnten Relaxationseffekte, wie sie für die Reaktionen der gravisensitiven Ciliaten beschrieben werden, über die hemmenden oder verstärkenden Eigenschaften eines Filamentsystems erklärt werden.

1.2.1. Einfluss von Beschleunigung auf das Schwimmverhalten von Ciliaten

Das schwerkraftabhängige Verhalten von *Paramecium* und *Tetrahymena* wurde, wie oben beschrieben, bereits früher untersucht (Fenchel & Finlay, 1986; Taneda et al., 1987; Hemmersbach-Krause & Häder, 1990; Machemer & Bräucker, 1992; Kowalewski, 1998). Beispielsweise wurden Ciliaten mit Hilfe einer Zentrifuge unterschiedlichen Beschleunigungen ausgesetzt. Dabei wurden eindeutige Verhaltensreaktionen beobachtet. Dabei richten sich *Paramecium* und *Tetrahymena* im Beschleunigungsfeld der Zentrifuge ebenso negativ gravitaktisch aus wie im Gravitationsfeld der Erde (Hiramoto & Kamitsubo, 1995;

Hemmersbach-Krause & Briegleb, 1992). Dabei zeigte sich, dass Ciliaten in der Lage sind, zumindest kurzfristig auch gegen stark erhöhte Beschleunigungen (bis 5g bei *Tetrahymena*, bis 13g bei *Paramecium*) anzuschwimmen und eine negative Gravitaxis aufrecht zu halten (Bräucker et al., 1994; Hemmersbach-Krause & Briegleb, 1992; Hemmersbach, 1996a). Unter Hypergravitationsbedingungen verstärkt sich nicht nur die Gravitaxis, sondern auch die Gravikinese von *Paramecium*. Der zeitliche Verlauf der beiden Schwerkraftantworten des Einzellers ist dabei unterschiedlich (Bräucker et al., 1994; Hemmersbach et al., 1996a).

Die Ciliaten reagieren auch auf die Erniedrigung bzw. den Wegfall der Beschleunigung. Diese Beobachtung konnte zum Beispiel bei Versuchen auf Höhenforschungsraketen gemacht werden. Nach kurzer Zeit in Mikrogravitation ($10^{-4}g$) relaxieren die ersten Reaktionen auf die erhöhte Startbeschleunigung, und das gerichtete Schwimmverhalten wird von ungerichtetem, „randomisiertem“, Schwimmen abgelöst (Hemmersbach-Krause et al., 1993a, b, 1994; Bräucker et al., 1998). Die Schwelle für die gravitaktische Reaktion liegt bei *Paramecium* bei 0,3g (Hemmersbach et al., 1996a).

Eine wichtige Frage ist in diesem Zusammenhang, ob veränderte Beschleunigungen auch die Konzentration der sekundären Botenstoffe cAMP und cGMP verändern. In der vorliegenden Arbeit sollen vergleichende Untersuchungen von *Tetrahymena* und *Paramecium* einen weiteren Ansatz für das Verständnis der Beteiligung der sekundären Botenstoffe an der Reizverarbeitung der Ciliaten bieten. Dazu wurde die Möglichkeit genutzt, die Einzeller sowohl unter Hypergravitation auf der Zentrifuge als auch unter Mikrogravitation (μg) auf einer Höhenforschungsrakete zu analysieren. Besonders die Untersuchungen der μg -Phase erlauben, Vorhersagen des Signaltransduktionsmodells (Abb. 1) zu prüfen.

1.3. Temperatur als Störreiz

Die Temperatur spielt im natürlichen Lebensraum der Einzeller eine wichtige Rolle. Neben der ökologischen Bedeutung im Wechsel der Lebensbedingungen z.B. während der Jahreszeiten und einer Anpassung an dadurch bedingte ungünstige

Nahrungssituationen können theoretisch auch direkte Anpassungen in der Zelle, wie ein reduzierter Stoffwechsel in niedriger Temperatur, stattfinden.

Die Temperatur, bzw. ein Temperaturgradient, können für Protozoen neben der Schwerkraft bei der gezielten Bewegung im Raum eine Rolle spielen. So sind für einige Einzeller, wie z.B. *Paramecium*, thermotaktische Reaktionen auf Temperaturgradienten bekannt (Tawada & Oosawa, 1972; Tawada & Miyamoto, 1973; Nakaoka & Oosawa, 1977; Nakaoka, 1982; Machemer, 1988). Damit muss eine Temperaturwahrnehmung durch die Zellen angenommen werden. Dabei ist die Frage offen, ob lediglich Gradienten oder auch die absolute Temperatur registriert werden können.

Die Temperatur spielt bei den durchgeführten Untersuchungen aber vor allem in anderer Hinsicht eine Rolle. Wie können sich temperaturbedingte morphologische und physiologische Anpassungen auf die Reiz-Reaktionsketten anderer Perzeptionswege, beispielsweise die Schwerkraftperzeption, auswirken? Ist jeder Umweltreiz isoliert zu betrachten oder finden auch Beeinflussungen und Verrechnungen verschiedener Reize untereinander statt? Als „Störreiz“ könnte die Temperatur betrachtet werden, wenn durch sie physikalische oder physiologische Gegebenheiten beeinflusst oder verändert werden, wie sie für die Schwerkraftreaktionen diskutiert werden. Erste Belege für eine Beeinflussung verschiedener Zellstrukturen (s. 1.3.1.) und der Gravisensitivität (s. 1.3.2.) durch die Umgebungs- bzw. Kultivierungstemperatur konnten schon dokumentiert werden (Freiberger, 1997).

Um diesen Einflüssen unter dem Gesichtspunkt der Störung von Signalwegen in der Zelle nachzugehen, wurden niedrige Kultivierungstemperaturen (10°C/4°C) über einen langen Zeitraum hinweg von mir als „Störreiz“ eingesetzt und einige als temperaturabhängig postulierte Eigenschaften der Einzeller untersucht, darunter die Zellform, die Gesamtzelldichte der Einzeller und physiologisch-biochemische Mechanismen, wie die Veränderung der Indolaminkonzentrationen.

1.3.1. Morphologische Veränderungen unter dem Einfluss von Temperaturveränderungen

Schon länger sind morphologische Veränderungen, die durch Temperaturveränderungen hervorgerufen werden, bei Einzellern bekannt. Vor allem sind Auswirkungen von erhöhten Temperaturen auf verschiedenste Zellstrukturen, z.B. die Struktur von Cytoskelettelementen, (Elliott et al., 1962; Elliott, 1973; Rosenbaum et al., 1966; Levy & Elliott, 1968; Inoue et al., 1975; Stockem & Korohoda, 1975; Torres & Delgado, 1989) festgestellt worden. Von cytoplasmatischen Tubulinstrukturen ist eine Empfindlichkeit gegenüber Kälte bekannt (Cachon & Cachon, 1980; Cohen & Beisson, 1988; Walin & Stromberg, 1995), durch die das Assembly der Strukturen gestört bzw. behindert wird. Es ist denkbar, dass Temperaturänderungen zu Veränderungen an den Verstärkerstrukturen, wie sie für die Reizperzeption der Einzeller postuliert werden (s. 1.2.), führen, dadurch das gravisensitive Verhalten der Ciliaten beeinflussen und so eine Erklärung für einige bereits vorliegende Befunde (s. 1.3.2.) bieten.

Die Form der Zelle wird durch die stabilisierenden Strukturen innerhalb der Zelle bestimmt. Sie ist durch Achsenverhältnis (Längs- zu Querachse), Fläche und deren Beziehungen zueinander charakterisiert. Ein physikalischer Mechanismus der Reizperzeption beruht auf der Funktion der Zelle als „Boje“ aufgrund ihrer Form. Dem Einfluss von Temperatur auf formstabilisierende Elemente bzw. der damit einher gehenden Änderung der Zellform wurde in den Untersuchungen daher besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Mit den Erkenntnissen aus diesen Untersuchungen sollte eine Abschätzung des physikalischen Einflusses auf die gravitaktische Reaktion versucht werden.

Veränderungen der Membranzusammensetzung unter Temperatureinfluss, z.B. bei *Tetrahymena*, wurden von verschiedenen Autoren dokumentiert (Nozawa & Thompson, 1979; Inoue & Nakaoka, 1990; Capdeville & Benwakrim, 1994; Sakamoto et al., 1997). Ein erhöhter Anteil an gesättigten Fettsäuren in der Zellmembran hält bei höherer Temperatur die lebensnotwendigen Membranfluidität aufrecht. Als Anpassung an niedrige Temperaturen würde der Anteil an ungesättigten Fettsäuren erhöht, so dass die Fluidität der Membran

erhalten bleibt. Dies könnte eine Erklärung für die Erhaltung der Reaktionsfähigkeit auf mechanische Reize bieten.

Von verschiedenen Organismen (Mikroorganismen wie Metazoa) ist das Phänomen des Frost- und Kälteschutzes durch verschiedene, in der Zelle eingelagerte, Speichermoleküle bekannt (Groß, 1997). Auch Unterschiede in der Speicherung von Lipiden zeigen sich bei an Kälte angepassten arktischen Ciliaten, was darauf hindeutet, dass Lipide auch als Kälteschutz dienen könnten. Ob Lipide bei Ciliaten in den gemäßigten Zonen ebenfalls eine solche Rolle übernehmen können, wurde bisher nicht untersucht. Da aber auch diese Einzeller in ihrer natürlichen Umgebung Wintersituationen überstehen müssen, wäre ein solcher Mechanismus denkbar. *Tetrahymena* verfügt über ein großes Spektrum an Neutrallipiden, die in der Zelle gespeichert werden und als Temperaturschutz interessant sein könnten (Holz & Conner, 1973).

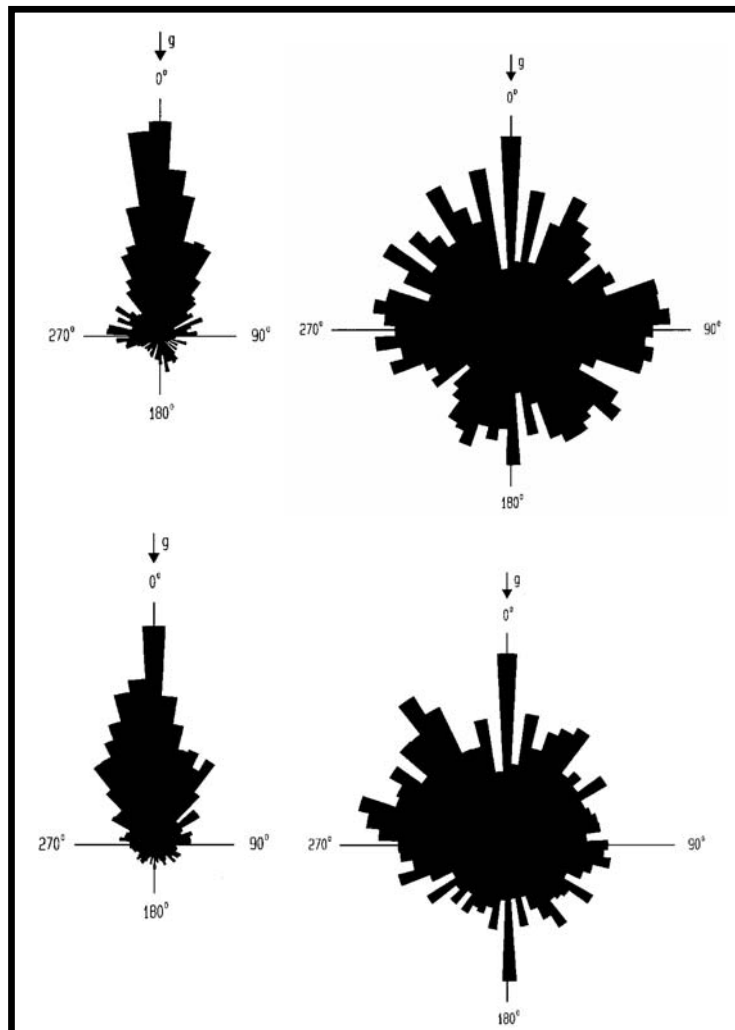
Diese Erkenntnisse bilden die Grundlage für die Überlegung, ob die Dichte der Zellen bei der physiologischen Perzeption und unter Umständen auch bei der physikalischen Ausrichtung der Einzeller eine Rolle spielt. Dabei ist von Bedeutung, dass der postulierte Mechanismus der Graviperzeption nicht mehr funktionieren kann, wenn das Cytoplasma durch Veränderungen der Lipidspeicher „zu leicht“ gegenüber dem umgebenden flüssigen Medium wird, da die Energie zur Öffnung der Ionenkanäle nicht mehr ausreicht (Abb. 1). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit der Verteilung der Speicherlipide im Cytoplasma besondere Aufmerksamkeit geschenkt.

1.3.2. Einfluss der Kultivierungstemperatur auf das Schwimmverhalten von Ciliaten

Im Rahmen meiner Diplomarbeit untersuchte ich den Einfluss der Kultivierungstemperatur auf das gravisensitive Verhalten verschiedener Einzeller (*Paramecium*, *Tetrahymena*, *Loxodes*, *Euglena*) (Freiberger, 1997). Hier zeigte sich bei Kultivierung über längere Zeiträume bei 4 °C und 10 °C, dass *Paramecium* und *Tetrahymena* keine Gravitaxis mehr zeigten (Abb. 2), ein gravikinetisches

Verhalten dagegen aber erhalten blieb. Diese Ergebnisse deuten wie bereits erwähnt an, dass beide Schwerkraftantworten auf verschiedenen Reaktionssystemen beruhen, bzw. an einer Stelle der Signaltransduktionskette „auseinanderlaufen“. Durch den Störreiz Temperatur war es offensichtlich möglich, diese beiden Systeme getrennt zu beobachten. Dies sollte im Rahmen der Promotionsarbeit überprüft und weiter analysiert werden. Dabei spielten auch andere Beobachtungen, wie die Verringerung der Schwimmggeschwindigkeit in der Kälte, eine Rolle, um beispielsweise die Fitness der Zellen beurteilen und erste Rückschlüsse auf die Einbindung der einzelnen Prozesse in das Gesamtbild ziehen zu können.

Abb. 2: Repräsentative Zirkularhistogramme der gravitaktischen Orientierung *Paramecium* (oben)



und *Tetrahymena* (unten): Nach wenigen Tagen in 10°C ist keine Gravitaxis mehr zu beobachten.
oben: links: Tag 7/10°C (N=1908); rechts: Tag 99/10°C (N=5086)
unten: links: Tag 3/10°C (N=7390); rechts: Tag 44/10°C (N=8062) (aus Freiburger, 1997).

1.4. Weitere physiologische und biochemische Gesichtspunkte der Reizperzeption von Einzellern

Bei Einzellern wurden, wie bei Metazoen, circadiane und annuare Rhythmen gefunden (Wille, 1979). Zyklische Abläufe zeigen sich vor allem in physiologischen und biochemischen Vorgängen. Die Konzentrationen verschiedener biochemisch relevanter Substanzen zeigen deutliche Schwankungen in distinkten zeitlichen Intervallen. Bei Einzellern hat man solche Konzentrationsveränderungen z.B. beim cyclischen AMP (Edmunds et al., 1992) und auch bei Melatonin und seinen Derivaten gefunden (Csaba, 1993; Hasegawa et al., 1997; Balzer & Hardeland, 1996; Kippert, 1996, 1997). Sowohl Melatonin als auch das Melatonin-Analogon 5`-Methoxy-Tryptamin (=5`MT) konnte bei verschiedenen Einzellern nachgewiesen werden. Der Dinoflagellat *Gonyaulax polyedra* war der erste Einzeller, bei dem Melatonin gefunden und eine Funktion bei der Encystierung zugewiesen werden konnte (Poeggeler et al., 1989, 1991; Hardeland et al., 1995; Hardeland & Fuhrberg, 1996; Fuhrberg et al., 1997). Teilweise reagieren Einzeller (Dinoflagellaten) bei der Encystierung auf das Analogon 5`Methoxy-Tryptamin wesentlich stärker, so dass die Vermutung besteht, dass dieses, zumindest bei den Dinoflagellaten, die eigentlich aktive Form ist (Balzer & Hardeland, 1991a, b; Hardeland et al., 1993). Man findet bei diesen Organismen die höchsten Konzentrationen von Melatonin im Bereich von bis zu 4 mM (Fuhrberg et al., 1997). Allerdings gibt es auch immer wieder sehr geringe Konzentrationen (ca. 0,04 µM) an Melatonin innerhalb der Zellen. Die Feststellung der Grenzen, innerhalb derer sich die Konzentration von Melatonin in den Zellen bewegt, ist nicht einfach, da bei der Aufarbeitung der Zellsuspensionen im Labor bereits ein Teil des Melatonins durch die Entstehung freier Radikale eliminiert werden kann (Hardeland, 1999a, b).

Biochemische Zyklen hängen oft nicht nur von den inneren Bedingungen der Zellen (internen Taktgebern), sondern häufig auch von äußeren Faktoren (externen Taktgebern) ab. Zu letzteren zählen physikalische Einflüsse der Umwelt wie Licht und auch Temperatur. Bei den Dinoflagellaten konnten solche Rhythmen z.B. bei der Encystierung mit photoperiodischen Abläufen gemessen werden. Ein Beispiel dafür ist die Encystierung bei *Gonyaulax polyedra* (Roenneberg et al., 1989; Balzer & Hardeland, 1991b; Hardeland et al., 1993; Tsim et al., 1997).

Melatonin und andere Indolamine dienen bei Einzellern wahrscheinlich nicht nur der Steuerung verschiedenster periodischer Zellprozesse, sondern auch als Oxidationsschutz. Die großen Konzentrationen an Melatonin und seinen Derivaten stellen einen sehr effektiven Schutz dar. Gerade das empfindliche Erbmateriale im Zellkern kann so gut vor dem Angriff durch freie Radikale bewahrt werden.

Die Frage, ob die Konzentrationen der beiden Metabolite Melatonin und 5`Methoxy-Tryptamin als kälteempfindliche biochemische „Zeitgeber“ bei *Paramecium* und *Tetrahymena* durch die Kultivierungstemperatur beeinflusst werden und damit Indikatoren für den Einfluss der Temperatur auf Stoffwechsel und Verhalten der Ciliaten in der Kältekultur sein könnten, ist Teil dieser Arbeit.

1.5. Ziele der Arbeit

Das physiologische Modell zur Perzeption und Weiterverarbeitung des Beschleunigungsreizes zeigt, dass viele Fragen zum genauen Ablauf der Reiz-Reaktionskette noch nicht gelöst werden konnten, auch wenn die Einzelprozesse teilweise schon gut dokumentiert sind. Die verschiedenartigen Untersuchungen im Verlauf dieser Dissertation bauen auf einigen der bereits in meiner Diplomarbeit beobachteten Befunde zu den Schwerkraftantworten der ausgewählten Ciliaten auf und sollen helfen, den Mechanismus der Schwerkraftperzeption weiter aufzuklären. Ein wichtiger Punkt ist dabei die Analyse der strukturellen und biochemischen Veränderungen, die durch zusätzliche Reize (Temperatur) und die Veränderung von Beschleunigungsbedingungen in den Zellen hervorgerufen werden.

Die im Weiteren dargestellten Untersuchungen leisten einen Beitrag zur Diskussion, ob die Schwerkraftorientierung von Einzellern als physikalischer oder physiologischer Prozess angesehen werden muss, oder ob sogar beide Aspekte in der Verhaltensausprägung der Zellen eine Rolle spielen können.

2. Material und Methoden

2.1. Organismen und Kulturen

Folgende Organismen wurden bei den Untersuchungen eingesetzt:

- *Paramecium biaurelia* (CCAP 1660/3C, Culture Collection of Algae and Protozoa, Ambleside, England)
- *Tetrahymena pyriformis* (Institut für Zellbiologie, Universität Bonn)

2.1.1. Kultivierung von *Paramecium biaurelia*

Systematik (nach Corliss, 1973, 1979)

Ciliophora

2. Klasse	Oligohymenophora
Unterklasse	Hymenostomata
1. Ordnung	Hymenostomatida
Familie	Parameciidae
	<i>Paramecium biaurelia</i>

Paramecium biaurelia ist durchschnittlich etwa 200-250 µm groß. Die Zellen wurden in einem nicht-sterilen Kulturmedium als Stammkultur kultiviert, die neben dem Ciliaten nicht näher definierte Nahrungsbakterien enthält. Für die Herstellung des Kulturmediums wurden 15 g Stroh zweimal in je 1 l Aqua bidest 15 min lang gekocht. Die Abgüsse wurden jeweils nach der Kochzeit zum Abkühlen in Weithals-Kunststoffgefäße (5 l Weithalsflaschen, Low Density Polyethylen, Qualilab) abgefüllt. Nach dem Abkühlen wurde das Medium mit 100 ml der Stammkultur beimpft und bei Raumtemperatur (20°C ± 0,05°C; Weiß Umwelttechnik, Reiskirchen) im Dunkeln kultiviert. Für die Kultivierung bei den niedrigeren Temperaturen (10°C / 4°C) wurde je ein Kulturbehälter mit einer dichten Paramecien-Kultur (ca. 2-3 Wochen alt) in die bereits auf die entsprechende Temperatur eingestellte Klimakammer (Weiß Umwelttechnik, Reiskirchen) gebracht. Parallel dazu wurde jeweils eine gleich alte Kultur bei 20°C gehalten. Die Kulturdichte und die Vitalität der Zellen wurden während der

gesamten Versuchszeit regelmäßig kontrolliert. Mit Hilfe einer Lupe (Zeiss) wurden Dichte und Vitalität der Kulturen einmal pro Woche überprüft.

Die Anreicherung der Zellen erfolgte bei den entsprechenden Temperaturen mittels Zentrifugation (1000 U/min, 40 s; Heraeus Labofuge 400e). Die angereicherten Zellen wurden in Versuchskammern oder Reaktionsgefäße pipettiert, wo sie für mindestens eine Stunde adaptierten, um mögliche Effekte einer Mechanostimulation durch die Zentrifugation abklingen zu lassen. Für die Untersuchung war eine Anreicherung der Zellen notwendig.

2.1.2. Kultivierung von *Tetrahymena pyriformis*

Systematik (nach Mehlhorn & Ruthmann, 1992)

Ciliophora

2. Klasse	Oligohymenophora
Unterklasse	Hymenostomata
1. Ordnung	Hymenostomatida
Unterordnung	Tetrahymenina
Familie	Tetrahymenidae
	<i>Tetrahymena pyriformis</i>

Tetrahymena pyriformis ist im Durchschnitt ca. 60-80 µm groß. Das Kulturmedium für *Tetrahymena* wurde nach dem folgenden Rezept erstellt:

Tetrahymena-Lösung I (basierend auf: Pringsheimlösung nach Chapman-Andresen, 1958):

200 ml	Pringsheimlösung I
200 ml	Pringsheimlösung II
+ 0,008 g	FeSO ₄ x 7 H ₂ O
ad 4 l Aqua bidest.	

Pringsheim I:

0,1 g	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$
0,125 g	KCl
ad 250 ml Aqua bidest.	

Pringsheim II:

1 g	$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4 \text{ H}_2\text{O}$
0,1 g	$\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$
ad 250 ml Aqua bidest.	

Tetrahymena-Kulturlösung (mit Nährstoffen) wurde nach dem folgenden Rezept angesetzt:

500 ml	<i>Tetrahymena</i> -Lösung I
500 ml	Aqua bidest.
7,5 g	Proteose Pepton
2,5 g	Trypton
0,15 g	Hefe-Extrakt

Beide *Tetrahymena*-Lösungen können als Vorrat eingefroren werden. Das Kulturmedium wurde vor dem Gebrauch 20 Minuten autoklaviert. Zum Umsetzen älterer *Tetrahymena*-Kulturen mit hoher Zelldichte wurden 7 - 8 ml Kulturmedium in neue, sterile Kulturröhrchen (25 ml) gefüllt und etwa 12 ml einer dichten Kultur zugefügt. Die Kultivierung erfolgte im Dunkeln bei 20°C. Zwei Wochen alte Kulturen, die für die Versuche eingesetzt wurden, mussten meist nicht angereichert werden. Für die Versuche bei den niedrigen Temperaturen wurden Experimentkulturen nach mindestens einer Woche Anzucht in 20°C verwendet, wenn sich eine dichte Kultur gebildet hatte. Für die Kurzzeitversuche wurden zwei Wochen alte Kulturen verwendet, um die gleichen Ausgangsbedingungen für Kontroll- und Experimentkulturen zu garantieren.

2.2. Untersuchungen zum Einfluss der Kultivierungstemperatur

Für beide Einzellerarten wurden niedrige Versuchstemperaturen gewählt, wie sie zum Einen in der natürlichen Umwelt vorkommen und zum Anderen bei Mikrogravitations-Versuchen z.B. auf Shuttle-Flügen zur Lagerung von Zellen benutzt werden. *Paramecium* konnte dabei in 10°C und 4°C untersucht werden, während *Tetrahymena* aufgrund von Verhaltensbesonderheiten (Bildung cystenähnlicher, immobiler Stadien), wie sie früher beschrieben wurden (Freiberger, 1997), nur bei 10°C weiterführend untersucht wurde. Die Kontrollen wurden bei 20°C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$) in einer Klimakammer (Weiß Umwelttechnik) kultiviert.

2.2.1. Viskositätsmessung

Zur Messung der Viskosität wurde ein Kapillar-Viskosimeter nach Ostwald verwendet. Dabei handelt es sich um eine U-förmige Glasröhre mit einer kugeligen Aufweitung unterhalb der Kapillare. Die Kapillarlänge beträgt 100 mm, das Durchflussvolumen 0,5 ml, die Druckhöhe 115 mm und die Füllmenge für die Messung 3 ml. Die Messungen der beiden Kulturmedien im Vergleich zu Aqua bidest. als Referenz erfolgte mit zwei baugleichen Viskosimetern mit einem Kapillardurchmesser von 0,5 mm.

Die Messung wurde nach jeweils 1 h Adaptionszeit in entsprechend temperierten Klimakammern (Weiß Umwelttechnik) durchgeführt. Dazu wurden jeweils 3 ml Flüssigkeit in das weitere Rohr des Viskosimeters eingefüllt. Nach dem Temperatenausgleich wurde die Flüssigkeit auf der Kapillarseite bis zur oberen Messmarke hochgesaugt und anschließend die Durchflusszeit zwischen den beiden Messmarken mit Hilfe einer Stoppuhr gemessen. Die Messung wurde für Aqua bidest und jedes Kulturmedium in allen Temperaturen (20°C, 10°C, 4°C) jeweils 10x wiederholt, um Messfehler zu minimieren.

Nach der Messung wurden zunächst nach der folgenden Formel Korrektursekunden errechnet:

Hagenbach-Korrektur $\eta = 0,12 / K \times t$

Die Konstante K beträgt für die verwendete Kapillare 0,03. Die Korrektursekunden werden von der gemessenen Zeit (t) abgezogen. Mit der Formel zur kinematischen Viskosität (ν) kann danach die Viskosität der verschiedenen Medien berechnet und verglichen werden:

$$\nu = K (t - \eta)$$

Mit der Stokes'schen Formel ($F_R = 6 \times \pi \times \nu \times r \times v$) [F_R = Reibungskraft; ν = Viskosität; r = Radius des Körpers; v = Geschwindigkeit des Körpers]) wurde im Anschluss die Kraft errechnet, die durch die Veränderung der Viskosität zusätzlich auf die Zellen ausgeübt wird. Dadurch konnte abgeschätzt werden, ob die Viskositätsänderung bei der Veränderung des Schwimmverhaltens eine Rolle spielen könnte.

2.2.2. Beeinflussung des Schwimmverhaltens

Zur Analyse verschiedener Verhaltenskomponenten (Gravikinese, Reversalrate) wurden die Zellen bei den untersuchten Kultivierungstemperaturen in Versuchskammern gefüllt und anschließend das Verhalten der Zellen beobachtet und aufgezeichnet.

2.2.2.1. Versuchsaufbau (Geräte und Messkammern)

Die Messapparatur wurde in den temperierten Klimakammern aufgebaut. Dabei handelte es sich wahlweise um ein Horizontalmikroskop oder eine Horizontallupe (beide: Zeiss). Die Versuche wurden bei Rotlicht (645 nm) in einer Dunkelfeldanordnung durchgeführt. Die mikroskopische Beobachtung von *Paramecium* erfolgte mit 2facher Vergrößerung, von *Tetrahymena* mit 3,2facher Vergrößerung des Zoomobjektivs. Bei der Horizontallupe wurde mit 6,4facher Vergrößerung gearbeitet. Mittels CCD-Kamera (S/W-Kamera BC 2, AVT-Horn) und Videorecorder konnten die Versuche aufgezeichnet werden. Die verwendeten Aufnahmen wurden im Verlauf meiner Diplomarbeit erstellt und in der vorliegenden Promotion weiter ausgewertet.

Die eingesetzten runden Messkammern, die für Versuche auf einer Höhenforschungsrakete (MAXUS) entwickelt wurden, bestehen aus Glas und einem Titanrahmen (Durchmesser 25 mm, Tiefe 1 mm, Volumen 0,7 ml) und erlaubten es, die Zellsuspension luftblasenfrei einzufüllen. Während der Versuchszeit wurden die Kammern senkrecht gelagert, so dass mechanische Reizungen durch eine Drehung direkt vor den Messungen umgangen werden konnten. Es war möglich, die Einzeller in den Messkammern über mehrere Stunden (bis zu 24 h) zu beobachten.

2.2.2.2. Computerunterstützte Bildverarbeitung

Mit Hilfe der computerunterstützten Bildanalyse wurden die Schwimmdaten der Einzeller berechnet und analysiert. Für die Bildverarbeitung standen verschiedene Programme zur Verfügung. Zunächst wurden Schwimmrichtung und Schwimmgeschwindigkeit mit Programmen erfasst, die eine vergleichende Analyse einzelner Frames der Videoaufzeichnung durchführen (Häder & Lebert, 1985; Häder & Vogel, 1991; Vogel, 1993). Dabei wurden eine Echtzeit-Videobildverarbeitungskarte (Framegrabber, Typ Matrox PIP 1024 bzw. Matrox Meteor, Matrox Electronic Systems Ltd., Quebec, Kanada) und ein PC benutzt.

Die Software ermöglichte die automatische Erkennung der Zellen und die Auflösung von Bewegungsrichtung und -geschwindigkeit mit einer Echtzeitverarbeitung von 25 Bildern pro Sekunde (40 ms / Bild). Die Bewegung wurde durch die Grauwertveränderung in einem Graustufenbild wahrgenommen. Dabei wurden Position, Achsen der Zellen sowie Größe des Organismus festgestellt und durch Verfolgung der Objekte über drei Frames Schwimmrichtung und -geschwindigkeit bestimmt. [Zur Berechnung der gravikinetischen Komponente s. 2.2.2.4.; zum r-Wert s. 2.4.1.]

Zur Analyse der Reversalrate der Zellen wurden die verfolgten Einzelframes der Videoaufzeichnung in Schwimmspuren umgerechnet (Vogel, 1993). Über die Erfassung der Spurabschnitte, die aus den Bildpunkten und den zugeordneten Zeitpunkten berechnet werden, konnten Richtung und Geschwindigkeit bestimmt werden. Eine Richtungsänderung kann durch den Datenvergleich der einzelnen

Spurabschnitte erkannt werden. Die untersuchten Einzeller zeigen bei einer Richtungsänderung ein charakteristisches Verhalten, indem sie zunächst stoppen und dann mit veränderter Richtung weiter schwimmen. Dieses Verhalten erlaubt die Festlegung von Schranken für Winkel und Geschwindigkeit, deren Überschreiten ein Reversal charakterisiert (Algorithmus und Programm wurden mir freundlicherweise von R. Bräucker zu Verfügung gestellt). Durch diese Angaben konnten die Spuren hinsichtlich Reversals und deren Anzahl untersucht werden.

2.2.2.3. Zeitschemata der Versuche

Die Dauer der verschiedenen Experimente orientierte sich an bereits gefundenen Verhaltensänderungen (Freiberger, 1997). Die Messungen erfolgten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Umsetzen in die unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen. Videoaufzeichnungen erfolgten nach der Anpassung (ein Tag) in den Kultivierungstemperaturen (Tab. 1). Als Kontrolle dienten Messungen an 20°C-Kulturen.

Tab. 1: Expositionsdauer in den Kultivierungstemperaturen

Spezies	Expositionsdauer (Tage)
<i>Paramecium</i> 10°C	1, 2, 7, 99
4°C	1, 3, 7, 106
<i>Tetrahymena</i> 10°C	1, 3, 7, 44

2.2.2.4. Bestimmung der Sedimentationsgeschwindigkeit und der gravikinetischen Komponente

Zur Bestimmung der gravikinetischen Komponente bei den unterschiedlichen Temperaturen war es notwendig, die Sedimentationsgeschwindigkeiten der Zellen bei den entsprechenden Hälterungstemperaturen zu messen. Dazu wurden die Einzeller durch die tropfenweise Zugabe von NiCl₂ (0,04 g/100 ml; max. 0,125 mM im Medium; vgl. Nagel et al., 1997) unter Beobachtung immobilisiert, um eine schonende Immobilisierung mit minimaler NiCl₂-Einwirkung zu erreichen. Nach etwa 1–2 min konnte die Paramecien-Suspension in die Versuchskammern gefüllt

und die Sedimentationsgeschwindigkeit unter Verwendung der computerunterstützten Bildverarbeitung bestimmt werden.

Aus den gerichteten Schwimmgeschwindigkeiten und der Sedimentationsgeschwindigkeit lässt sich die gravikinetische Komponente der Einzeller nach Machemer et al. (1991) berechnen:

$$(v_u - v_o) / 2 = S + \Delta \Rightarrow \Delta = (v_u - v_o) / 2 - S$$

v_u = Abwärtsschwimmgeschwindigkeit

v_o = Aufwärtsschwimmgeschwindigkeit

Δ = gravikinetische Komponente

S = Sedimentationsgeschwindigkeit

2.2.3. Untersuchungen zur Zellmorphologie

Die Zellmorphologie könnte verschiedenen Einflüssen durch die Temperatur unterliegen. Dabei spielen unter Umständen sowohl externe als auch interne Faktoren eine Rolle. Die folgenden Methoden wurden bei der Analyse dieser Faktoren eingesetzt.

2.2.3.1. Dichtezentrifugation

Es sollte geklärt werden, ob durch die Hälterung bei den niedrigeren Temperaturen physikalische Eigenschaften der Zelle geändert werden. Zur Vorbereitung der Untersuchung wurden die Zellen der verschiedenen Kältekulturen sowie einer Referenzkultur aus 20°C angereichert (siehe 2.1.1). Nach der Anreicherung wurden die Zellen mit Nickelchlorid immobilisiert (s. 2.2.2.4.).

Die Untersuchung der Dichte der Zellen erfolgte danach durch eine Dichtezentrifugation (1000 U/min, 2 min) in dichteangepasstem Medium. Dazu wurden mit sterilem Medium und einer Percolllösung verschiedene Ausgangsdichten hergestellt (Rezept: Schmidt, 1997). Nach dem Mischen von 2/3 dieser Dichtelösung mit 1/3 immobilisierter Kultur wurden die immobilisierten

Einzeller vor der Zentrifugation kurz durch vorsichtiges Schütteln gleichmäßig in Suspension gebracht. Nach der Zentrifugation wurde die Verteilung der Zellen unter der Lupe bei geeigneter Vergrößerung kontrolliert und beurteilt. Diese Prozedur wurde mehrfach wiederholt.

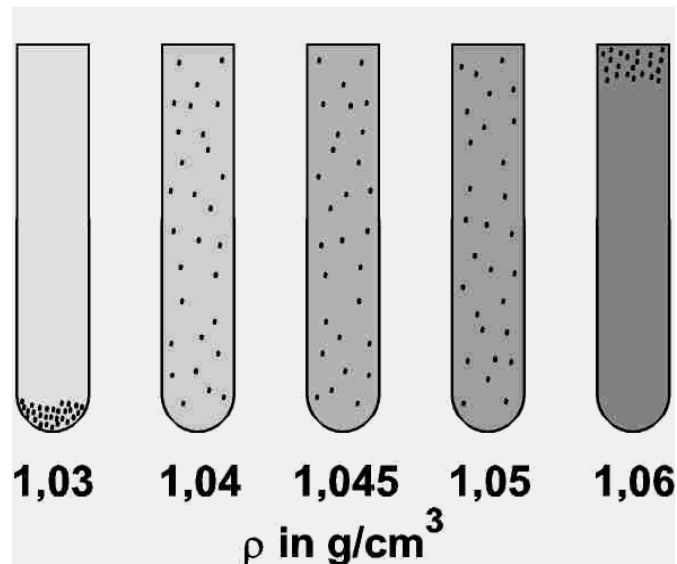


Abb. 3: Die exemplarische schematische Darstellung zeigt die Verteilung immobilisierter Zellen nach der Zentrifugation im Medium. Die Verteilung ist dabei direkt abhängig von der Dichte des eingesetzten Mediums und erlaubt so eine Aussage über die Gesamtdichte der Zellen.

2.2.3.2. Bestimmung der Formfaktoren (Zellfläche, Achsenverhältnisse)

Zur Untersuchung der Zellform wurden zunächst mit der computerunterstützten Bildverarbeitung Standbilder der Videoaufzeichnung hergestellt. Bei der Analyse der digitalen Bilder, wobei ein Größen- und ein Grauwertfilter die Zellen vom Hintergrund trennten, konnten die Objekte im Anschluss durch manuelle Selektion ausgewertet werden. Ein Analyseprogramm erfasste nach der Kalibrierung Fläche und Hauptachsen der Zellen und berechnete aus der Kombination der verschiedenen Faktoren die Form und Größe der Zellen in der zweidimensionalen Ansicht (Algorithmus und Programm: R. Bräucker). Für die Frage nach der Abrundung der Zellen waren das Verhältnis von Längs- zur Querachse und die Fläche (= Größenmaß) besonders wichtig (Abb. 4). Beruhend auf der Annahme, dass beide Protozoen Rotationselipsoiden nahe kommen, wurde analysiert in welchem Maße in den niedrigen Temperaturen Veränderungen auftreten. Eine Untersuchung der Häufigkeitsverteilung der Formfaktoren in der betrachteten

Population zu unterschiedlichen Zeitpunkten sollte zeigen, ob die Veränderungen bestimmte Tendenzen im Laufe der Kultivierung zeigen.

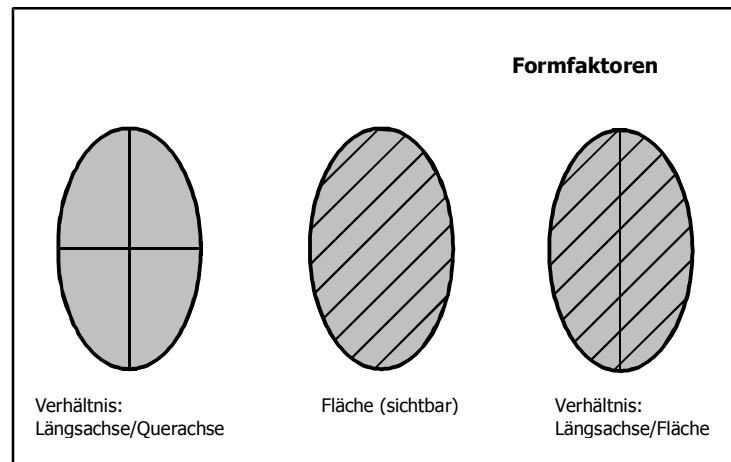


Abb. 4: Die dargestellten Schemata verdeutlichen die vermessenen Formfaktoren der Einzeller. Die Form der Zellen wurde zum Verständnis stark vereinfacht

2.2.3.3. Mikroskopische Untersuchung der fixierten Einzeller: Elektronenmikroskopie und Fluoreszenzmikroskopie (Konfokales Laser-Scanning)

In der vorliegenden Arbeit wurden elektronenmikroskopische und fluoreszenzmikroskopische Methoden angewandt, um verschiedene morphologische Strukturen zu untersuchen.

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden die Zellkulturen in einer Simultanfixierung mit Osmiumtetroxid und Glutaraldehyd (Endkonzentration: 1% OsO_4 + 2% GA) in Cacodylatpuffer (0,05 M, pH 7,2) 30 min auf Eis fixiert. *Tetrahymena*-Zellen wurden aufgrund der teilweisen Ausfällung des Osmiumtetroxids noch für 30 min nachosmiert. *Paramecium* wurde mit einer Fixierung nach Parducz (5 ml 2%iges OsO_4 in 0,8 ml gesättigtem HgCl_2) behandelt, die bei diesem Ciliaten bessere Ergebnisse brachte (Hayat, 1981; Robinson, 1985).

Nach mehrmaligem Waschen wurden die Zellen in Agar-Agar (2%ig, Difco) eingebettet und über mehrere Alkohol-Verdünnungsstufen zur Einbettung in Kunstharz (LR white) überführt. Nach dem Aushärten im Wärmeschrank (60°C, 48

h) wurden die Präparate in einem Ultramikrotom ultradünn geschnitten. Die Schnitte wurden mit einem Diamantmesser hergestellt und auf feine beschichtete Kupfernetze gezogen. Nach dem Trocknen wurde eine Nachkontrastierung in zwei Schritten mit 1% Bleicitrat und gesättigtem alkoholischen Uranylacetat durchgeführt. Nach 12-24 h waren die Schnitte vollständig getrocknet und konnten im Transmissions-Elektronenmikroskop (TEM; EM 10, Zeiss) analysiert und fotografiert werden. Die Vergrößerungsfaktoren wurden zum Vergleich der Strukturen konstant gewählt:

Tab. 2: Vergrößerungsfaktoren bei der Elektronenmikroskopie

Spezies	Vergrößerung
<i>Paramecium</i>	2 500fach
<i>Tetrahymena</i>	3 000fach

Die Aufnahmen wurden nach der Entwicklung eingescannt und digital bearbeitet. Dabei wurden keine Veränderungen vorgenommen, die die Strukturen der Zelle betreffen. Lediglich Kontrast, Schärfe und durch die Schnittführung am Mikrotom bedingte Artefakte wurden bearbeitet (Picture Publisher, Micrografix).

Eine Untersuchung der räumlichen Verteilung der Speicherlipidtropfen innerhalb der Protozoenzellen konnte mit Hilfe einer Fluoreszenzfärbung und anschließendem dreidimensionalen Scannen der Zellen durchgeführt werden.

Die Färbung der Neutrallipide der fixierten Zellen (Formaldehyd, FA, 7%) erfolgte mit Nilrot. Dazu wurde eine Stammlösung von Nilrot (DMSO 99%, Nilrot 100 µg/ml) bei der Färbung mit TRIS-Puffer (9,5 mM Endkonzentration) auf eine Endkonzentration von DMSO/Nilrot 5%/5 µg/ml angesetzt. Die Färbelösung wurde auf ein Pellet der fixierten Zellen appliziert. Nach 30 min im Dunkeln konnte die Farblösung mit TRIS-HCl-Puffer ausgewaschen werden. Die gefärbten Zellen konnten über mehrere Tage kalt und lichtgeschützt in TRIS-HCl-Puffer (0,6 M, pH 7,4) aufbewahrt werden (Greenspan et al., 1985; Diaspro & Robello, 2000).

Nilrot besetzt selektiv die neutralen Lipide in den Zellen. Dabei treten Fluoreszenzen bei zwei verschiedenen, distinkt getrennten Wellenlängenbereichen auf:

Tab. 3: Fluoreszenzmikroskopie: Wellenlängenbereiche der Anregung und Emission

Anregung	Emission
450-500 nm „gold“	> 528 nm
515-560 nm „rot“	> 590 nm

Die beiden Emissionsspektren können mit Hilfe des konfokalen Laser-Scanning-Mikroskops (Mikroskop: Leica DM RBE, Laser: Leica TCS 40, Leica Lasertechnik GmbH) erzeugt werden. Bei einer Anregung durch den Laser bei 510 ± 90 nm und einer Emission bei 590 nm sind die Lipidtropfen selektiv darstellbar.

Zum optimalen Scannen der Zellen war es notwendig, sie durch Zugabe von Glycerin am Objektträger zu fixieren. Je nach Größe der Objekte wurden im Folgenden zwischen 30 und 50 optische Schnitte hergestellt und als digitale Daten abgespeichert. Die Aufnahmen wurden danach elektronisch bearbeitet, um die Kontraste noch zu optimieren und Hintergrundfluoreszenz herauszufiltern.

2.2.4. Nachweis von Indolaminen

Der Nachweis von Melatonin und 5-Methoxy-Tryptamin erfolgte mittels HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie). Mit dieser Methode können sehr kleine Mengen verschiedenster Substanzen nachgewiesen werden. Dabei wird besonders bei der Auftrennung mehrerer Indole aus einer einzigen Probe eine große Genauigkeit erreicht. Durchgeführt wurden die Messungen mit der Unterstützung von Dr. Ivonne Balzer teils in Göttingen, teils in Köln.

2.2.4.1. Darstellung von Indolaminen mit Hilfe der HPLC (Hochdruckflüssigkeitschromatographie)

Paramecium-Kulturen aus den verschiedenen Hälterungstemperaturen wurden zunächst durch Watte gefiltert, um störende Schmutzpartikel zu entfernen, anschließend zur Anreicherung zentrifugiert (2.1.1) und gesammelt. Von der konzentrierten Suspension wurden je 2 ml für eine Probe abgenommen. Bei *Tetrahymena*-Kulturen wurden direkt aus verschiedenen Kultivierungsröhrchen je 2ml von oben abgenommen und zunächst in einem gemeinsamen Pool gesammelt. Die gepoolten *Tetrahymena*-Kulturen wurden anschließend wieder in 2ml-Proben aufgeteilt. Alle Arbeiten wurden unter Rotlicht ausgeführt. Die zu untersuchenden Indolamine (Melatonin und 5-Methoxy-Tryptamin) sind lichtempfindlich und zerfallen unter Lichteinwirkung sehr schnell. Rotlicht, wie auch eine geringe Lichtintensität, kann diesen Zerfall verlangsamen (Frowein & Lapin, 1979). Sämtliche Kulturen wurden schon im Vorlauf der Untersuchungen im Dunkeln gehalten, um eine Synchronisation der Kulturen mit einem externen Taktgeber wie das Licht zu verhindern.

Die angereicherten Proben wurden im Verhältnis 1:1 mit TRIS-HCl-Puffer (0,6 M, pH 8,6) in einem Porzellanmörser mit flüssigem Stickstoff schockgefroren. Während der Stickstoff verdampfte, wurden die Proben gemörsert, bis nur noch ein weißes Pulver übrig blieb. Dieses wurde in Plastikröhrchen überführt und bei -80°C lichtgeschützt bis zur weiteren Aufarbeitung eingefroren.

Zur Aufbereitung der Proben tauten diese bei Raumtemperatur unter Rotlicht auf, wurden in Reagenzgläser überführt und anschließend durch Zugabe von 3 ml kaltem Diethyläther extrahiert. Die Extraktion erfolgte bei 4°C für 30-60 min auf einem Schüttler (GFL 3016, mittlere Stufe).

Nach der anschließenden Zentrifugation (5 min, 3000 U/min; Heraeus Labofuge 400e) lagen zwei Flüssigkeitsphasen, eine wässrige und eine Ätherphase, vor. Zur Trennung wurden die Röhrchen kurz in flüssigen Stickstoff getaucht. Die wässrige Phase mit dem Pellet gefror, so dass die Ätherphase, die die Indole enthielt, abgegossen werden konnte. Nach dem Auftauen wurde die wässrige Phase mit

dem Pellet zur Proteinbestimmung verwendet (s. 2.3.5.). Die Ätherproben dampften über Nacht unter dem Abzug ab. Nach dem Lösen der abgedampften, trockenen Überstände im Laufmittel (Acetonitril 100 µl; 99,93%, HPLC grade, Aldrich) wurden diese in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und lichtgeschützt bei –80°C eingefroren. Das Lösungsmittel war zur Verwendung als Laufmittel 4:6 mit Aqua bidest. verdünnt worden.

2.2.4.2. Beschreibung der HPLC-Apparatur

Die HPLC-Anlage der Firma LKB (LKB Biotechnology, Bromma, Schweden) bestand aus den folgenden Komponenten:

- HPLC-Pumpe (LKB Bromma, 2150 HPLC Pump) [Flussrate: 0,25 ml/s im Probendurchlauf; 0,01 ml/s im Leerlauf]
- HPLC Controller (LKB Bromma, 2152 LC Controller) [Pumpensteuerung]
- Entgaser (DEGASYS DG-1310, uniflows) [zwischen Laufmittelflasche + Pumpe]
- Ultrograd Mixer Driver (LKB Bromma, 11300) [Homogenisierung der Lösung]
- manuelles Proben-Aufnahmesystem (Syringe Loading Sample Injector, Modell 7125, Rheodyne, Cotati, California, USA) + Spritze (100 µl, Glas) [zur Probeninjektion]
- HPLC-Säule (Phenomenex, Typ: Luna 5u C18(2), Größe: 250 x 4,60 mm, 5u micron) [Auftrennung der Probe]
- Wärmetauscher [Temperaturanpassung]
- variabler HPLC-UV Detektor (LKB 2141, Variable Wavelength Monitor) [Analyse, 280nm, konstante Frequenz von 100 s⁻¹, Lichtweg: 6 mm, ca. 3 Stunden bis zur stabilen Nulllinie (Aqua bidest.)]

Mit der Pumpe wurde ein kontinuierlicher Durchfluss des Laufmittels durch die Säule gewährleistet. Der Entgaser sorgte für die luftblasenfreie Weiterleitung der Lösung. Die Flussrate war für den Probenlauf auf 0,25 ml/s, für den Leerlauf auf 0,01 ml/s eingestellt worden. Nach der manuellen Eingabe der Probe lief diese durch die HPLC-Säule, in der die Auftrennung erfolgte. Durch Bestrahlung mit UV-Licht ($\lambda = 280 \text{ nm}$) konnte das Säuleneluat mit einem HPLC-UV-Detektor auf seine Einzelkomponenten analysiert werden. Vor der Detektion sorgte ein Wärmetauscher für die Temperaturanpassung des Eluats, um Verfälschungen

durch Temperatureffekte zu vermeiden. Nach jedem Probenlauf musste Aqua bidest. eingespritzt werden, um die Säule zu reinigen und erneut eine Nulllinie als Basis für die nächste Probe einzustellen.

2.2.4.3. Kalibrierung und Auswertung

Die Kalibrierung der Messapparatur erfolgte durch externe Standards. Zur Herstellung der Standards wurden zunächst je 3 mg 5-Methoxy-Tryptamin oder Melatonin in 50 µl Methanol gelöst und dann mit der Laufmittelmischung auf 1 ml aufgefüllt [300 µg/100 µl]. Aus diesem Gemisch wurde durch 1:10-Verdünnung mit dem Laufmittel die Stammlösung [30 µg/100 µl] angesetzt. Durch weitere Verdünnungsstufen nach dem gleichen Verhältnis erhielt man die Anwendungslösungen der Standards:

Standard A: 3000 ng/100 µl

Standard B: 300 ng/100 µl.

Die Berechnung der Flächen-Konzentrationskorrelation und der Ausdruck der Werte erfolgte durch einen Integrator C-R3A BASIC (Shimadzu Corporation, Analytical Instruments Plant, Kyoto, Japan). Die Integration der „Peakfläche“ nach der Standardisierung erlaubte die Berechnung der Indolmengen. Nach der Umrechnung auf die Proteinmengen der eingesetzten Proben konnten die tatsächlichen Indolkonzentrationen der Proben berechnet werden.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse der HPLC-Messungen ist zu beachten, dass im Verlauf dieser Arbeit nur eine einmalige Durchführung der Untersuchungen möglich war, da die Geräte für weitere Messungen nicht mehr zur Verfügung standen.

2.3. Bestimmung der Second-Messenger-Konzentrationen

Zur Untersuchung der Beteiligung von sekundären Botenstoffen an der Reizverarbeitung bei Einzellern wurden Versuche in Hyper- und Mikrogravitation durchgeführt. Die im Folgenden beschriebenen Versuchsanordnungen wurden aufgrund der technischen Vorgaben des Experiments auf der Höhenforschungsrakete ausschließlich bei Raumtemperatur (20°C) durchgeführt.

2.3.1. Zentrifugationsversuche

Tetrahymena-Zellen wurden nach einer Anreicherung und einer anschließenden Ruhezeit von 1 h mit verschiedenen Umdrehungszahlen unterschiedlich lange zentrifugiert und während der Zentrifugation fixiert (Tab. 4):

Tab. 4: Fixierungszeitpunkte und Beschleunigungen der Zentrifugationsversuche

U/min	= g-Zahl	Fixierungszeitpunkte während der Zentrifugation
0 (Kontrolle)	1g	5s/1min/5min/10min
149	3g	5s/1min/5min/10min
186	5g	5s/1min/5min/10min
240	9g	5s/1min/5min/10min

Die Umdrehungszahl, mit der sich bei bekanntem Radius der Zentrifuge (Hettich Universal II, umgebaut) die g-Zahl berechnen lässt, wurde mit Hilfe eines optischen Drehzahlmessers festgestellt. Fixiert wurden die Zellen mit 2M Perchlorsäure (PCA) bei Raumtemperatur während der Zentrifugation. Dazu wurden mit PCA gefüllte Einwegspritzen auf einer mitlaufenden Scheibe oberhalb der Zentrifugenbecher positioniert. An den Spritzen waren flexible Schläuche befestigt, die bis in die Proben in den Zentrifugenbechern reichten. Mit Hilfe einer zweiten, verschiebbaren Scheibe über der ersten konnten die Spritzenstempel

zeitgleich während der Zentrifugation gedrückt und das Fixans in die Proben injiziert werden. Durch die Fixierung während der Zentrifugation wurden mögliche Effekte einer mechanischen Reizung beim Abstoppen der Zentrifuge vermieden. Es wurden jeweils 4 Proben gleichzeitig fixiert. Parallel wurden jeweils 4 Kontrollproben bearbeitet. Nach der Fixierung wurden die Proben weiter zur cAMP-Bestimmung aufgearbeitet (s. Abschnitt 2.3.3.).

2.3.2. Versuche unter Mikrogravitation auf einer Höhenforschungsrakete (TEXUS 39)

Um biochemische Reaktionen der Einzeller auf Mikrogravitation zu analysieren, wurden Proben auf einer Höhenforschungsrakete (TEXUS 39, Kiruna, Schweden) in verschiedenen Phasen des Fluges fixiert. Die Ciliaten waren in der Startphase des Fluges zunächst einer Linearbeschleunigung mit einem Maximum bei 9,7g, danach einer zentrifugalen Spinbeschleunigung von maximal 2g ausgesetzt. Nach dem Abschalten der Triebwerke und dem Abstoppen des Stabilisierungsspins trat dann eine mehrere Minuten (ca. 6 min) dauernde μ g-Phase ein (Tab. 5). Die Einzeller und das Fixans (PCA, 2 M) befanden sich in Spritzen (2 ml-Einwegspritzen, Polypropylen, Braun, Omnifix Luerlock) in einem computergesteuerten Modul. Die Spritzen mit dem Fixans und den Zellen lagen sich horizontal gegenüber und waren durch ein Verbindungsstück miteinander verbunden. Zur Abdichtung diente eine Teflonkugel, um eine Vermischung der Spritzeninhalte vor dem Versuchsbeginn zu verhindern (Abb. 5).

Während des Flugs wurde das Fixans pneumatisch in die Probenspritze gepresst. Der Druck reichte aus, um eine schnelle homogene Durchmischung zu garantieren. Die Proben wurden nach dem folgenden Zeitschema fixiert:

Tab. 5: Fixierungszeitpunkte während des TEXUS 39-Experimentes

Fixierung [s seit dem Start (=0)]	<i>Paramecium</i> [Probenzahl]	<i>Tetrahymena</i> [Probenzahl]	Beschleunigung [TEXUS 39]
-3	6	6	1g
+46	4	4	$\pm 9,7g$
+64	4	4	$10^{-2}g$
+70	4	4	$10^{-3}g$
+85	4	4	$10^{-4}g$
+95	4	4	$10^{-4}g$
+185	4	4	$10^{-4}g$
+249	4	4	$10^{-4}g$
+379	4	-	$10^{-4}g$
+400	4	4	$10^{-4}g$

Etwa eine Stunde nach Landung wurden die Proben aus den Spritzen in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und eingefroren. Der Transport von Kiruna nach Köln erfolgte auf Trockeneis. Die Aufarbeitung und biochemische Untersuchung wurde wie nachfolgend beschrieben (2.3.3. – 2.3.5.) durchgeführt.

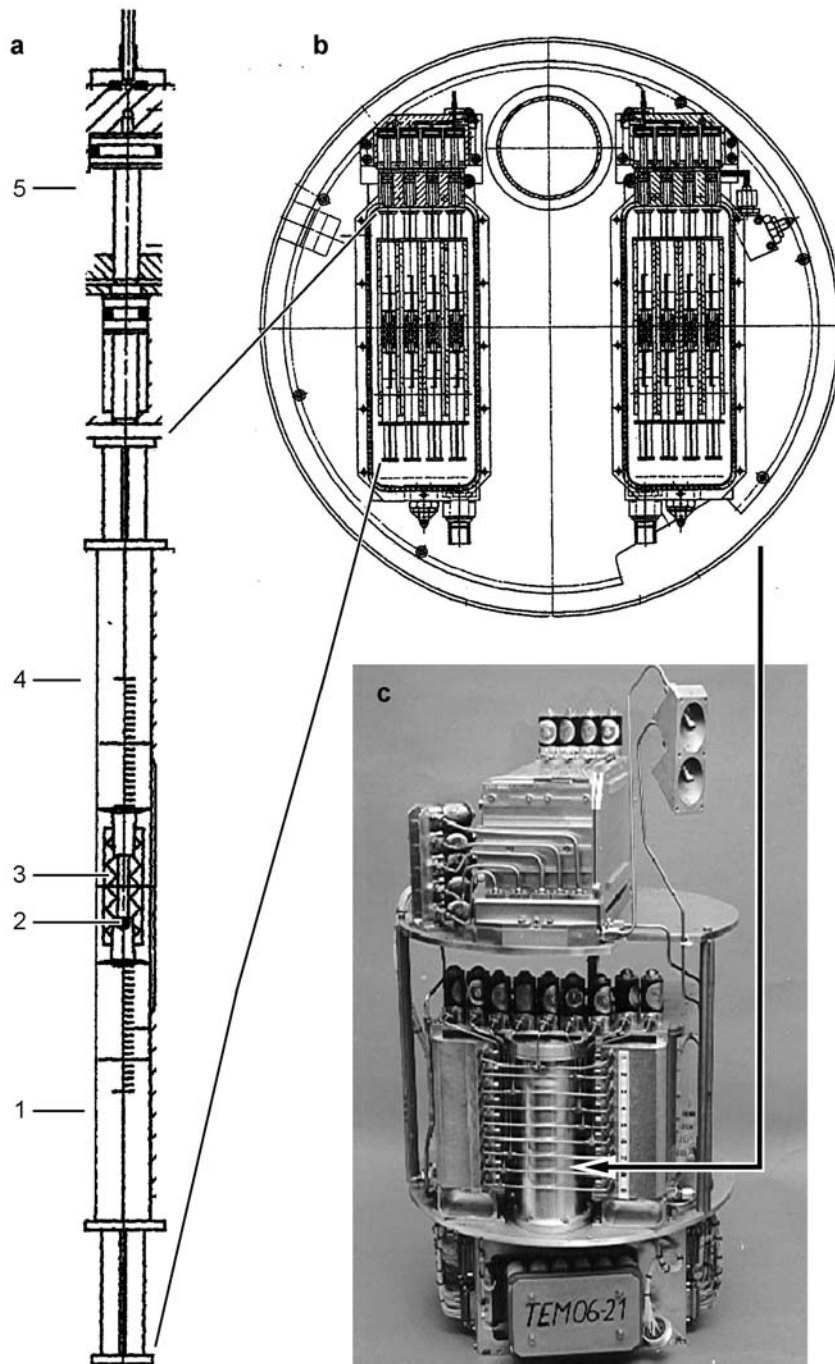


Abb. 5 a – c:

a: Zwillingskonstruktion der Experimentierspritzen (1: Spritze 1, enthält 1 ml Zellsuspension, 2: Teflonkugel, 3: Verbinder, 4: Spritze 2, enthält 1 ml Fixativ, 5: Auslösemechanismus)

b: Experimentierplattform mit zwei Einschüben

c: Ansicht des Modul TEM 06-21 (mit freundlicher Genehmigung der ASTRIUM-GmbH Bremen)

2.3.3. cAMP-Bestimmung

Die fixierten Zellen wurden in einem Glashomogenisator (Fortuna) mechanisch aufgeschlossen. Danach wurde das Homogenat abzentrifugiert (15000 U/min, 15 min, 4°C; Heraeus-Zentrifuge 1R, Heraeus Sepatech) und in Überstand und Pellet aufgetrennt. Der klare Überstand enthielt das cAMP und wurde zur weiteren Verwendung mit Natronlauge neutralisiert.

Der neutralisierte cAMP-Extrakt wurde in einem Lyophilisator (Alpha 1-4, Christ) gefriergetrocknet und anschließend in 0,2 M Phosphatpuffer (pH 7,25) gelöst. Die cAMP-Konzentration konnte dann in einem angepassten cAMP-Fluoreszenz-Immuno-Assay (cAMP-FIA) bestimmt werden (Dressendörfer, 1994). Die Funktionsweise des FIA beruht auf einer spezifischen Antikörperreaktion des cAMP. Das aus der Probe stammende cAMP besetzt dabei die Antikörper und verhindert eine Reaktion mit dem Fluoreszenzmittel. Die Fluoreszenz fällt um so geringer aus, je mehr cAMP bindet. Mit Hilfe einer Standardkurve kann dann berechnet werden, wieviel cAMP genau in der untersuchten Probe vorhanden war (Steiner et. al., 1970).

Zur Analyse wurden Mikrotiterplatten nacheinander mit zwei verschiedenen Antikörpern (1. Anti-cAMP (Goat), 2. Rabbit-Anti-Goat) beschichtet, auf die im Folgenden die Proben und eine definierte Standardreihe mit cAMP für die Eichkurve aufgetragen wurden. Für die Fluoreszenz des Assays ist eine Europium-Streptavidin-Lösung (EU-Stav) verantwortlich, die kurz vor der Messung zugesetzt wird. Die Messung erfolgte mit einem Fluorometer (1234 Delfia Research Fluorometer, Wallac Oy). Die Werte wurden in allen Fällen jeweils im Triplett für vier voneinander unabhängige Proben bestimmt. Nach der Umrechnung auf das ursprüngliche Überstandsvolumen und der Standardisierung auf die Proteinmengen der entsprechenden Proben, war ein Vergleich der cAMP-Gehalte der verschiedenen Probengruppen möglich (Ivanova, pers. Mitteilung; Dressendörfer, 1994).

2.3.4. cGMP-Bestimmung

Parallel zur cAMP-Bestimmung wurde ein Anteil der Proben zur Bestimmung des cGMP-Gehaltes der Zellen genutzt. Diese erfolgte mit Hilfe eines Radio-Immuno-Assays (RIA) (Ivanova et al., 1990). Der RIA basiert auf einer Antikörper-Antigen-Reaktion, bei der das cGMP das Antigen darstellt. Zur Standardisierung der Proben wurden die Proteinwerte verwendet, die schon zur Bestimmung der realen cAMP-Werte ermittelt wurden.

Die für den RIA vorgesehen Proben wurden nach dem Lyophilisieren in einem Natriumacetat-Puffer (50 nM, pH 4,0) gelöst und anschließend zusammen mit Standardkonzentrationen und Kontrollen (1,5 nm, 5,5 nm, unspezifische und maximale Bindung) im Triplet in Immunoröhrchen (PP, Sarstedt) pipettiert (je 50 µl). Anschließend wurden jeweils 50 µl Tracer (s.u.) und 50 µl Antikörpergemisch (1. Antikörper: γ -Globulin (Kaninchen, Sigma), 2. Antikörper: Ziege (a) Kaninchen pur, DIANOVA) in Natriumacetat-Puffer mit 0,5% BSA (Rinderalbumin, Sigma) + 0,9 %iger NaCl) pro Röhrchen zugefügt. Zwei Immunoröhrchen wurden zur Bestimmung der Totalaktivität nur mit Tracer beschickt. Nach dem Verschluss der Röhrchen (Eindrückstopfen, Sarstedt) erfolgte die Inkubation der Proben über Nacht bei 4°C.

Während der Inkubation binden Tracer und Proben (markiertes und unmarkiertes cGMP) an die Antikörper und konkurrieren dabei um die Bindungskapazitäten der vorhandenen Antikörper. Hohe cGMP-Konzentrationen in der Probe werden daher durch eine geringe Radioaktivität und niedrige Konzentrationen durch eine hohe Radioaktivität bei der Messung repräsentiert. Es wird im Prinzip das Verhältnis von gebundenem zu freiem markierten Antigen bestimmt, wobei durch die eingesetzte Antikörpermenge eine maximale Bindungskapazität vorgegeben wird (Steiner et. al., 1970)

Nach der Inkubation wurden die Proben durch die mehrfache Zugabe von 250 µl NaCl-Puffer, Zentrifugation (3600 U/min, 10 min, 10°C) und anschließendes Absaugen gewaschen. Die trockenen Röhrchen konnten dann in Zählrahmen

überführt und die Radioaktivität in einem Gamma-Counter (Wallac, 1470 Wizard, Automatic Gamma Counter, Wallac) gemessen werden. Die cGMP-Konzentration wurde im Folgenden aus der Verrechnung mit der parallel bearbeiteten Standardkurve und der jeweiligen Proteinmenge der entsprechenden Proben (2.3.5.) ermittelt [pM cGMP/mg Protein].

2.3.5. Proteinbestimmung

Nach dem Auflösen und Hydrolysieren in 1N Natronlauge (über Nacht) konnte das Pellet zur Proteinbestimmung (Lowry, 1951) verwendet werden. Der Proteinnachweis nach Lowry wurde in Referenz zu definierten BSA-Konzentrationen (Bovine Serum Albumin; Sigma) durchgeführt. Zunächst pipettiert man dazu je 20 µl der BSA-Standardkonzentrationen bzw. der Proben, 30 µl 0,8 N NaOH und 150 µl Kupferreagenz in die einzelnen Wells einer Mikrotiterplatte. Nach einer ersten Inkubation (10 min), in der ein Protein-Kupfer-Komplex entsteht, wurde Folinreagenz zugegeben, das während einer zweiten Inkubation (30 min) eine Farbreaktion hervorruft. Die Extinktion ($E = \log I_0/I$; I_0 = einfallendes Licht, I = austretendes Licht) wurde mit einem Photometer (Anthos Mikrosysteme GmbH) bei 630 nm gemessen. Die Färbung der Proben war dabei um so intensiver, je höher die Proteinkonzentration war. Über die BSA-Eichkurve konnte die Proteinkonzentration der Proben errechnet werden.

2.4. Statistische Methoden

Für die Bewertung der verschiedenen Ergebnisse wurden unterschiedliche statistische Tests genutzt.

2.4.1. Auswertung des Schwimmverhaltens

Die zur statistischen Auswertung der Schwimmbahnen, -geschwindigkeiten und -richtungen benutzte Zellzahl N entspricht der Anzahl der erfassten/ausgewerteten Zellspuren. Die Messparameter wurden dabei so gewählt, dass eine mehrfache Erfassung einer Zelle möglichst ausgeschlossen werden konnte; doppelte Zählungen sind jedoch nicht völlig auszuschließen. Als wichtige Parameter wurden

die Präzision der Orientierung (r-Wert), die mittleren Schwimmgeschwindigkeiten und Standardabweichungen berechnet. Die Differenzierung der Schwimmgeschwindigkeiten in die verschiedenen Raumrichtungen (v-oben: $360^\circ \pm 30^\circ$; v-unten: $180^\circ \pm 30^\circ$) erlaubte die Berechnung der gravikinetischen Komponente der Raumorientierung (s. 2.2.2.4.).

Der Rayleigh-Test (Batschelet, 1965; 1981; Häder et al., 1981) gibt ein Maß für die Präzision der Orientierung der Zellpopulation an. Der r-Wert kann zwischen 0 (Zufallsverteilung) und 1 (absolute Orientierung) liegen. Um eine bevorzugte Orientierungsrichtung beurteilen zu können, ist die Angabe des Vorzugswinkels θ [°] (der ebenfalls von der Bildverarbeitung erfasst wird) notwendig (Häder et al., 1981).

Bei der Bestimmung der Reversalrate wurden die Konfidenzbereiche der medianen Werte berechnet. Die Signifikanz der Abweichungen wurde durch geeignete statistische Tests bestimmt.

2.4.2. Auswertung der morphologischen Untersuchungen

Die statistische Auswertung der Formfaktoren der Zellpopulationen aus den verschiedenen Kultivierungstemperaturen erfolgte durch eine Analyse der Häufigkeitsverteilung innerhalb der Zellpopulation. Mit Hilfe eines χ^2 -Test konnte die Signifikanz der gefundenen Ergebnisse überprüft werden. Damit kann festgestellt werden, inwiefern die gefundenen Verteilungen bzw. das Verteilungsmuster übereinstimmen bzw. sich unterscheiden. So wird eine Aussage darüber möglich, ob echte Verschiebungen in der Population stattgefunden haben oder die Effekte auf Messungenauigkeiten zurückzuführen sein könnten bzw. die natürliche Varianz der beobachteten Phänomene so groß ist.

Die Beurteilung der mikroskopischen Ergebnisse erfolgte auf der Grundlage der optischen Betrachtung einer großen Anzahl von Objekten. Zur Darstellung wurden typische Bilder ausgewählt, die die gefundenen Veränderungen dokumentieren.

2.4.3. Auswertung der Second-Messenger-Bestimmungen

Die genaue Anzahl der Zellen in einer einzelnen Probe konnte bei der Aufteilung der Proben und der biochemischen Aufarbeitung aufgrund der benötigten großen Zellzahl nicht in ausreichender Genauigkeit festgelegt werden. Unterschiede konnten über die Bestimmung der Proteinmenge (steht in Korrelation zur Zellmenge) in einem bestimmten Probenvolumen ausgeglichen werden. Die Verrechnung der ermittelten Konzentrationen der Second-Messenger mit Proteinkonzentration und dem eingesetzten Probenvolumen diente der Normierung der Proben. Bei der Beurteilung und Darstellung der Proben wurde die Spannweite der Werte, d. h. die jeweils größten und kleinsten gemessenen Konzentrationen zu einem Probenzeitpunkt, dargestellt.

3. Ergebnisse

Bei der Untersuchung des Einflusses von veränderten Kultivierungstemperaturen und Beschleunigungen auf verschiedene Aspekte der Morphologie und Physiologie von Einzellern wurden die folgenden Ergebnisse gefunden.

3.1. Verhaltensänderungen während der Langzeitkultivierung der Einzeller in niedriger Temperatur

Im Rahmen der Promotion konnte *Paramecium* bei 10°C und 4°C über ein Jahr lang (450 Tage) in Dauerkultur gehalten werden. *Tetrahymena* wurde bis zu 100 Tage bei 10°C ohne Mediumwechsel kultiviert. Beide Protozoenarten zeigten dabei keine erkennbaren (regelmäßige optische Kontrolle von Stichproben) Veränderungen in Bezug auf ihre Vitalität. Die Zellen schwammen und teilten sich weiterhin während der Kultivierung in Kälte.

3.2. Ergebnisse der Verhaltensuntersuchungen

3.2.1. Gravitaxis und Gravikinese von *Tetrahymena*

In der vorliegenden Arbeit wurde das gravitaktische und das gravikinetische Verhalten von *Tetrahymena pyriformis* (in 10°C-Langzeitkultur) untersucht und mit den bereits vorliegenden Ergebnissen (Freiberger, 1997) zur Gravikinese und Gravitaxis von *Paramecium* verglichen (s. 1.3.2.).

Der r-Wert, der die Präzision der Orientierung der Einzeller und damit ihre Fähigkeit zur Gravitaxis dokumentiert, zeigte nach kurzer Zeit (3 Tage) bei niedriger Temperatur eine deutliche Tendenz gegen 0, d.h. die Zellen hatten ihre Fähigkeit verloren, sich anhand der Schwerkraft im Raum auszurichten. Nach etwa 3 Tagen bei 10°C wurde ein Rückgang des r-Wertes auf von 0,53 (Θ : $360^\circ \pm 5^\circ$) auf 0,364 (Θ : $360^\circ \pm 30^\circ$) beobachtet (Abb. 6). Nach diesem Zeitpunkt (ab Tag 7) zeigte *Tetrahymena* keine negative Gravitaxis mehr, der r-Wert sank zunächst weiter ab (0,038 an Tag 7), stieg dann wieder leicht an (auf 0,13), blieb jedoch

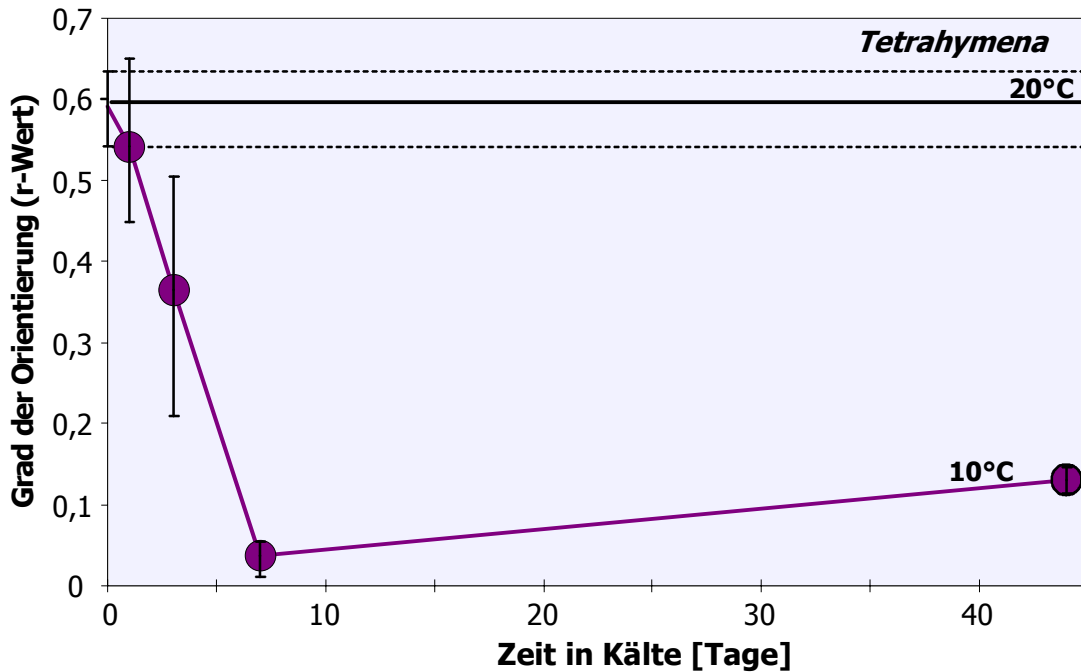


Abb. 6: Abnahme der Präzision der Orientierung (r-Wert) bei der Kultivierung von *Tetrahymena pyriformis* in niedriger Temperatur im Vergleich zur Haltung bei Raumtemperatur ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ = Kontrolle (schwarze Linien), gestrichelt = Konfidenzbereich der Kontrolle). Ein nahe 1 mit Θ um $0^{\circ}/360^{\circ}$ steht für eine präzise negative Gravitaxis, ein r-Wert nahe 0 für eine Zufallsverteilung. Die Zellen zeigen bis zu drei Tage lang eine hohe Präzision der negativen Gravitaxis, verlieren dann aber ihre Orientierung. ($N \geq 1000$ Zellspuren/Messpunkt)

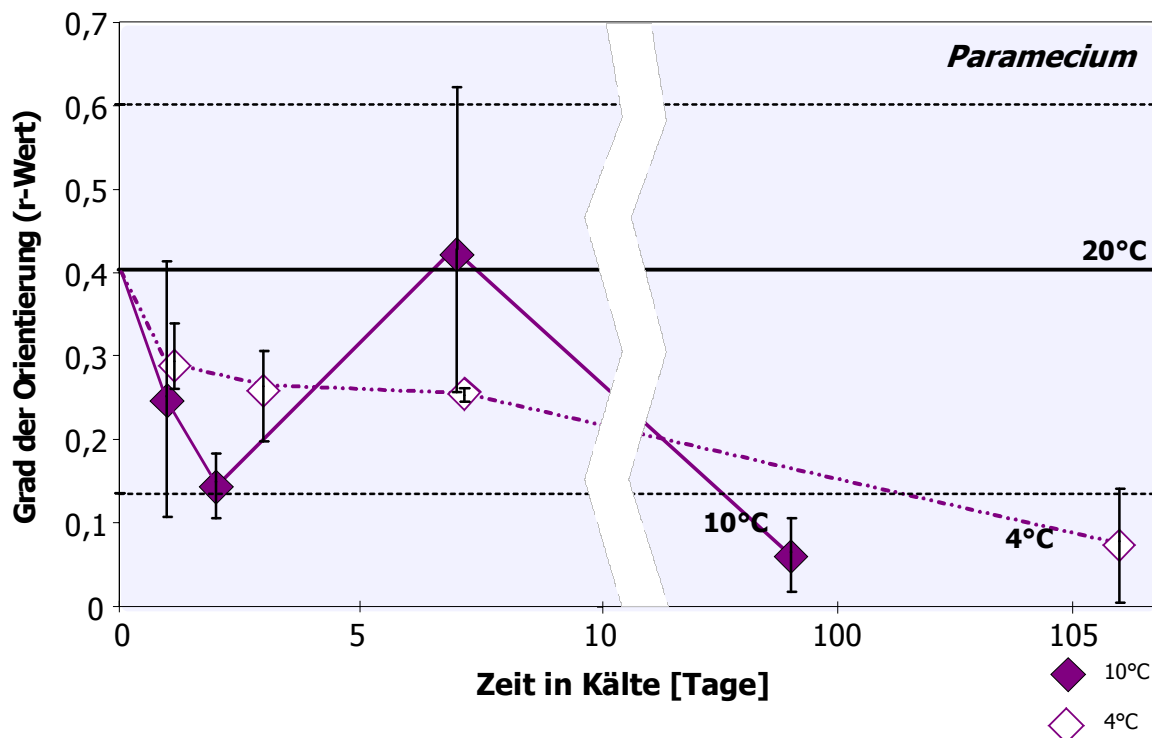


Abb. 7: Veränderungen der Präzision der Orientierung (r-Wert) bei der Kultivierung von *Paramecium biaurelia* in niedriger Temperatur im Vergleich zur Haltung bei Raumtemperatur ($20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ = Kontrolle (schwarze Linien), gestrichelt = Konfidenzbereich der Kontrolle). Die Zellen zeigen bis zu sieben Tage lang eine hohe Präzision der negativen Gravitaxis, verlieren in der Langzeitkultur jedoch ihre Orientierung. Ein nahe 1 mit Θ um $0^{\circ}/360^{\circ}$ steht für eine präzise negative Gravitaxis, ein r-Wert nahe 0 für eine Zufallsverteilung. ($N \geq 1000$ Zellspuren/Messpunkt)

immer weit unter den Werten in 20°C (Schwankungsbereich in Raumtemperatur zwischen 0,635 und 0,541 – Θ : $360^\circ \pm 5^\circ$). Die Abnahme des r-Wertes verlief dabei relativ kontinuierlich, obwohl die Schwankungen um den mittleren Wert zunächst größer wurden ($\pm 0,295$ an Tag 3 in 10°C gegenüber $\pm 0,094$ in 20°C). Nach dem Wegfall der Gravitaxis wurden die Schwankungen minimal, etwa $\pm 0,038$ im Durchschnitt ab Tag 7 in der niedrigeren Temperatur.

Im Vergleich zu *Tetrahymena* stellten sich die Veränderungen bei *Paramecium* wesentlich uneinheitlicher dar (Abb. 7). Der Schwankungsbereich der r-Werte war bei 20°C sehr groß und reichte von 0,601 bis 0,136 (Θ : $360^\circ \pm 15^\circ$). In den ersten Tagen bei 10°C (Tag 1-2: 0,35 bis 0,23; Θ : $360^\circ \pm 35^\circ$) bzw. 4°C (Tag 1-3: 0,41 bis 0,11; Θ : $360^\circ \pm 15^\circ$) lagen die r-Werte, bei bestehender Gravitaxis, innerhalb des 20°C-Bereichs, nach 7 Tagen zwischen 0,622 und 0,257 (Θ : $360^\circ \pm 20^\circ$) bei 10°C bzw. zwischen 0,268 und 0,252 (Θ : $360^\circ \pm 30^\circ$) bei 4°C. Die Gravitaxis ging bei *Paramecium* nach etwa 14-20 Tagen verloren. Ab diesem Zeitpunkt sank auch der r-Wert deutlich unter die bei 20°C gemessenen Werte ($<0,1$). Die Schwankungen der einzelnen r-Werte nahmen auch in den Kälte-Langzeitkulturen im Gegensatz zu *Tetrahymena* nicht ab.

3.2.1.1. Schwimmgeschwindigkeiten von *Tetrahymena* unter Temperatureinwirkung

Bei *Tetrahymena* war ein deutlicher Unterschied in den Aufwärts- und Abwärtsgeschwindigkeiten zu finden (Abb. 8). Trotz eines allgemeinen Rückgangs der Schwimmgeschwindigkeiten in den niedrigen Temperaturen um etwa 200 $\mu\text{m/s}$, fand sich immer ein Unterschied zwischen den Aufwärts- und Abwärtsschwimmgeschwindigkeiten von maximal 87 $\mu\text{m/s}$ bis minimal 44 $\mu\text{m/s}$. Dabei blieb die nach oben gerichtete Schwimmgeschwindigkeit stets kleiner als die nach unten gerichtete. Die Sedimentationsgeschwindigkeit nahm in den niedrigen Temperaturen nicht signifikant ab (20°C: $21 \mu\text{m/s} \pm 3 \mu\text{m/s}$; 10°C: $19 \mu\text{m/s} \pm 3 \mu\text{m/s}$; $N \geq 500$ Zellspuren). Die Berechnungen der Gravikinese zeigten, dass *Tetrahymena* die Sedimentationsrate bei 20°C (21 $\mu\text{m/s}$) um ca. 8% und am ersten Tag in 10°C um ca. 12% überkompensiert, nach dem dritten Tag aber nur noch 82% der Sedimentation kompensiert. In der Langzeitkultur (44

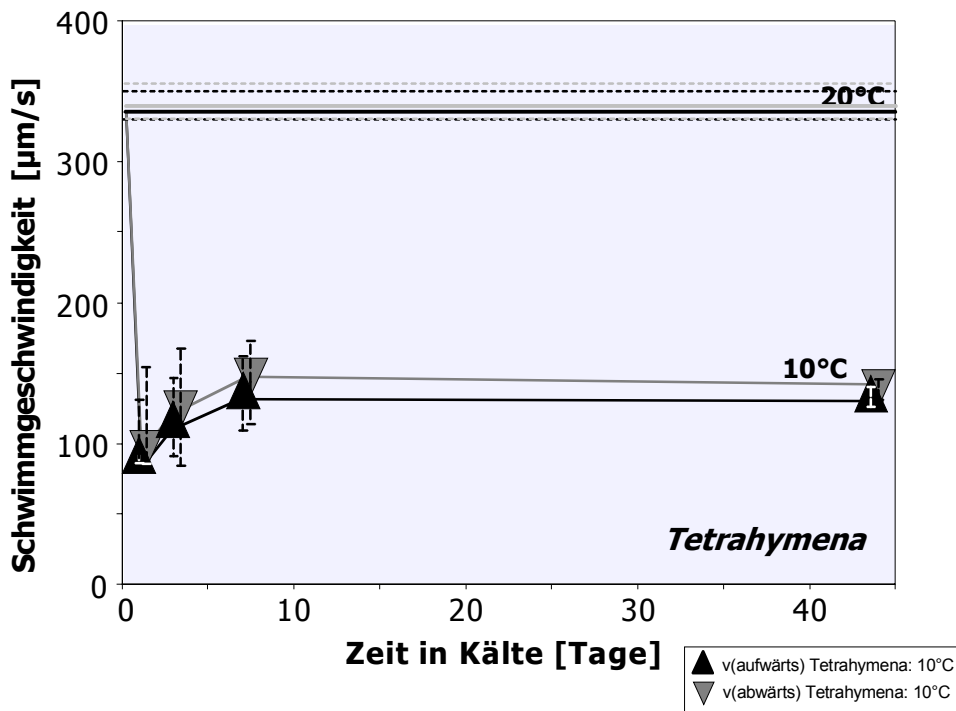


Abb. 8: Aufwärts- und Abwärtsschwimmgeschwindigkeiten (v) von *Tetrahymena* während der Kultivierung in 10°C im Vergleich zur Haltung bei Raumtemperatur (20°C \pm 1°C = Kontrolle) (Linien, gestrichelt = Konfidenzbereich, hellgrau: abwärts- v ; dunkelgrau: aufwärts- v). Die Schwimmgeschwindigkeiten sind bereits ab dem ersten Tag in der niedrigen Temperatur reduziert und bleiben, trotz eines leichten Anstiegs, auf einem niedrigen Niveau. ($N \geq 1000$ Zellspuren/Messpunkt)

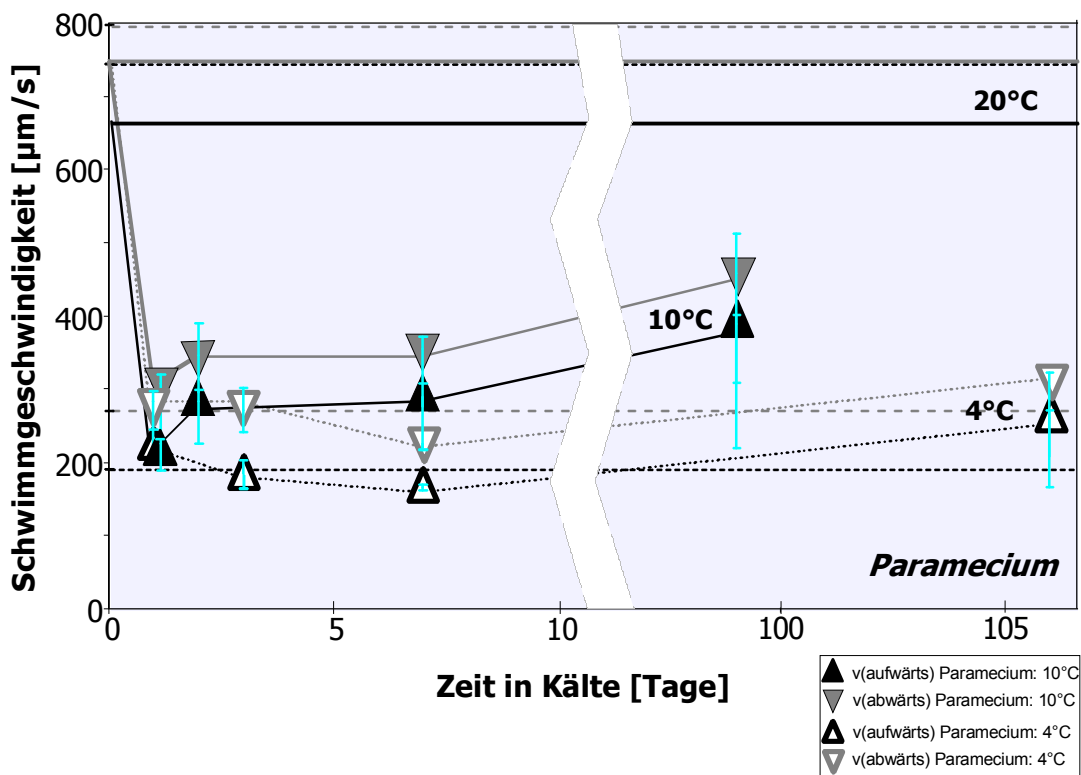


Abb. 9: Aufwärts- und Abwärtsschwimmgeschwindigkeiten (v) von *Paramecium* während der Kultivierung in niedriger Temperatur (10°C und 4°C) im Vergleich zur Haltung in Raumtemperatur (20°C \pm 1°C = Kontrolle) (Linien, gestrichelt = Konfidenzbereich, hellgrau: abwärts- v ; dunkelgrau: aufwärts- v). Die Schwimmgeschwindigkeiten sind bereits ab dem ersten Tag in der niedrigen Temperatur reduziert und bleiben, trotz eines leichten Anstiegs, auf einem niedrigen Niveau. ($N \geq 1000$ Zellspuren/Messpunkt)

Tage; 10°C) kompensiert *Tetrahymena* die Sedimentation nur noch zu 75%. Der Wert der gravikinetischen Komponente Δ stieg von $-22,65 \mu\text{m/s}$ bei 20°C auf $-13,75 \mu\text{m/s}$ bei 10°C an. Der Schwankungsbereich der Gravikinese Δ bei *Tetrahymena* war dabei in den ersten Tagen der Kältekultur sehr groß (zwischen $-8,57 \mu\text{m/s}$ und $-22,83 \mu\text{m/s}$ am dritten Tag) (Abb. 10).

Bei *Paramecium* lagen die Werte der gravikinetischen Komponente Δ während der niedrigen Temperaturen immer im Schwankungsbereich der 20°C-Werte zwischen $-47 \mu\text{m/s}$ und $-136 \mu\text{m/s}$ (Abb. 11). Dabei liegen die mittleren Werte in 10°C bzw. 4°C etwas über bzw. unter denen in 20°C. Die mittleren Werte der gravikinetische Komponente Δ lagen in 10°C zwischen $-7 \mu\text{m/s}$ und $-18 \mu\text{m/s}$ über dem mittleren Wert in 20°C. In 4°C lagen die Werte für die gravikinetische Komponente Δ meist zwischen $-10 \mu\text{m/s}$ und $-15 \mu\text{m/s}$ unter dem medianen 20°C-Wert (Abb. 11). Die mittleren Auf- und Abwärtsschwimmgeschwindigkeiten nahmen in der Kälte deutlich ab (Abnahme etwa 60% (10°C), etwa 75% (4°C) gegenüber $723 \mu\text{m/s} \pm 200 \mu\text{m/s}$ in 20°C (Freiberger, 1997) (Abb. 9). Diese Werte lagen jedoch immer innerhalb des Schwankungsbereiches der 20°C-Werte. In den Langzeitkulturen stiegen die Schwimmgeschwindigkeiten wieder leicht an.

Im Vergleich zu *Paramecium* zeigte sich also bei *Tetrahymena* eine deutlich von 20°C abweichende Größe der gravikinetischen Reaktion in beiden niedrigen Temperaturen.

3.2.2. Reversalraten von *Paramecium* und *Tetrahymena*

Ciliaten zeigen beim Schwimmen gelegentliche Reorientierungsbewegungen, Reversals, die von den Öffnungswahrscheinlichkeiten der Ionenkanäle abhängen. In der vorliegenden Untersuchung waren bei *Tetrahymena* etwa 0,099 Reversals pro Zelle und Sekunde und bei *Paramecium* etwa 0,185 Reversals pro Zelle und Sekunde als Ausgangsfrequenz (20°C) zu beobachten. Dagegen zeigten sich bei Kulturen, die in niedrigen Temperaturen kultiviert wurden, spezifische Veränderungen.

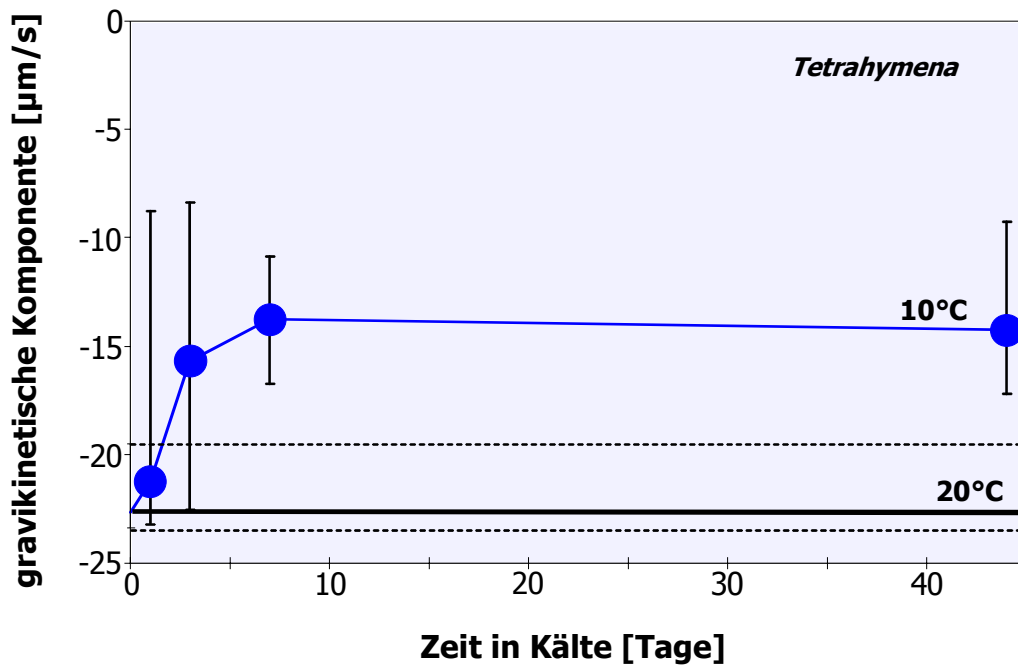


Abb. 10: Gravikinetische Komponente Δ bei *Tetrahymena* während der Kultivierung in 10°C (blau) im Vergleich zur Haltung in Raumtemperatur (20°C \pm 1°C = Kontrolle (Linien), gestrichelt = Konfidenzbereich der Kontrolle). Trotz positiver werdender Werte verlieren die Einzeller die Fähigkeit zur Kompensation der Sedimentation auch nicht in der Langzeitkultur in der niedrigen Temperatur. (N \geq 1000 Zellspuren/Messpunkt)

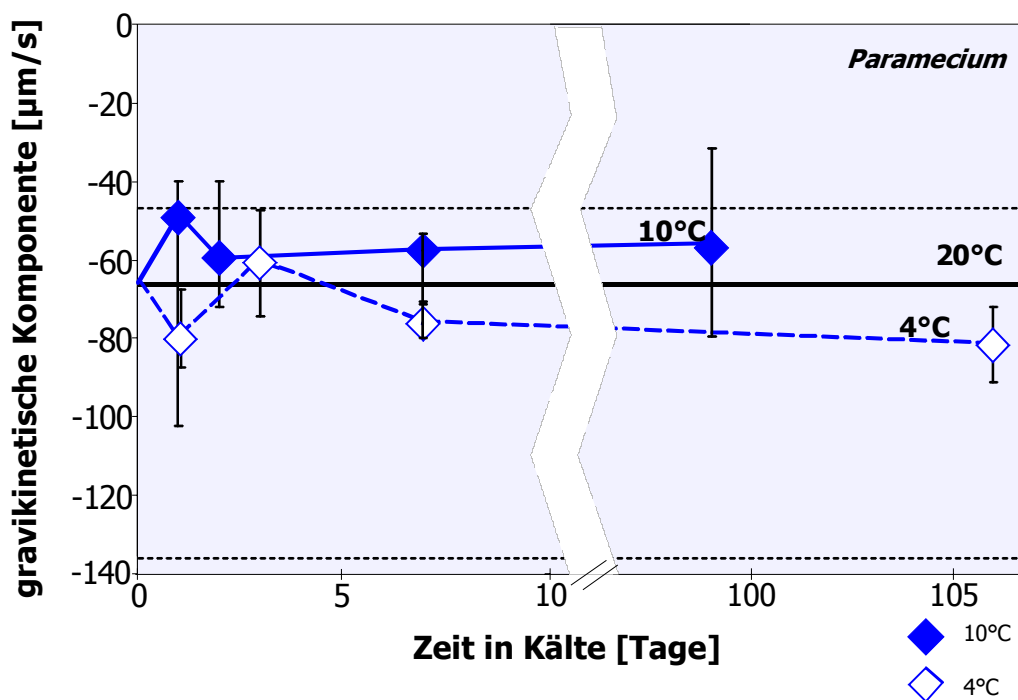


Abb. 11: Gravikinetische Komponente Δ bei *Paramecium* während der Kultivierung in 10°C (blau) im Vergleich zur Haltung in Raumtemperatur (20°C \pm 1°C = Kontrolle (Linien), gestrichelt = Konfidenzbereich der Kontrolle). Die Ciliaten verlieren die Fähigkeit zur Kompensation der Sedimentation auch in der Langzeitkultur in den niedrigen Temperaturen nicht. (N \geq 1000 Zellspuren/Messpunkt)

Paramecium zeigte eine deutlich verminderte Reversalrate in den Versuchstemperaturen gegenüber der durchschnittlichen Rate in 20°C (Abb. 12). Die Zellen reorientierten sich wesentlich seltener und folgten somit länger der einmal eingeschlagenen Richtung. In 10°C nahm die Rate kontinuierlich mit der Dauer der Kultivierung in niedriger Temperatur ab und schien sich nach etwa 14 Tagen in der Langzeitkultur langsam zu stabilisieren. Sie lag dann in der Langzeitkultur (99 Tage) bei ca. 53% des ursprünglichen Wertes. Bei 4°C-Hälterung sank die Rate ebenfalls gegenüber der Reversalzahl in 20°C ab (Minimum 7. Tag bei 0,04 Reversals pro Zelle und Sekunde). Bei Langzeitexposition stieg sie jedoch wieder auf 60% des 20°C-Wertes an.

Bei *Tetrahymena* zeigten sich entgegengesetzte Veränderungen in der Reversalrate im Zusammenhang mit der Kultivierungstemperatur und der Dauer der Kultivierung in den niedrigen Temperaturen (Abb. 13). Die Rate stieg in den ersten Tagen in der Kälte an und zwar bis zu 0,17 Reversals pro Zelle und Sekunde am 7. Tag gegenüber der Ausgangsfrequenz von 0,099 Reversals pro Zelle und Sekunde bei 20°C. Bei längerer Adaptation sank die Rate auf 0,117 Reversals pro Zelle und Sekunde ab und näherte sich damit wieder dem 20°C-Wert an. *Tetrahymena* schwamm also unter Kälteeinfluss zunächst weniger geradlinig und führte zu 22% häufiger Reorientierungsbewegungen als in 20°C aus. Nach einer Adaptionzeit von 44 Tagen verschwand die anfängliche Reaktion fast vollständig; dies steht im Gegensatz zu dem Verhalten, welches bei *Paramecium* beobachtet wurde.

3.2.3. Viskosität der Kulturmedien

Das Schwimmverhalten von Einzellern kann von den Eigenschaften des umgebenden Mediums beeinflusst werden. Die Kontrolle der Viskosität des Mediums bzw. der Veränderungen der Viskosität durch die Kultivierungstemperatur war daher notwendig.

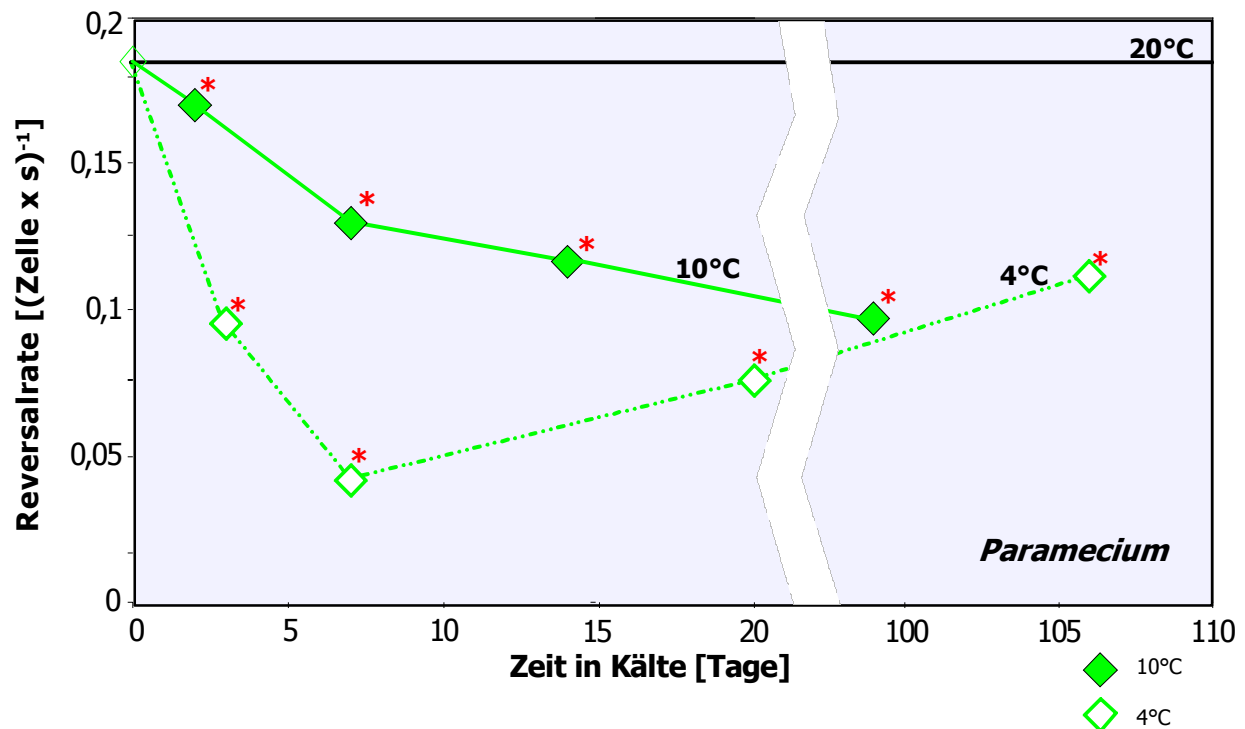


Abb. 12: Reversalfrequenz von *Paramecium* bei der Kultivierung in niedriger Temperatur im Vergleich zur Haltung in Raumtemperatur ($20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ = Kontrolle (schwarze Linie)). Die Reversalfrequenz sinkt in den ersten Tagen in niedriger Temperatur deutlich ab. In der Langzeitkultur setzt sich dieser Trend in 10°C weiter fort, während die Reversalfrequenz in 4°C wieder leicht ansteigt. ($N \geq 500$ Zellen/Messpunkt) (* = signifikanter Unterschied)

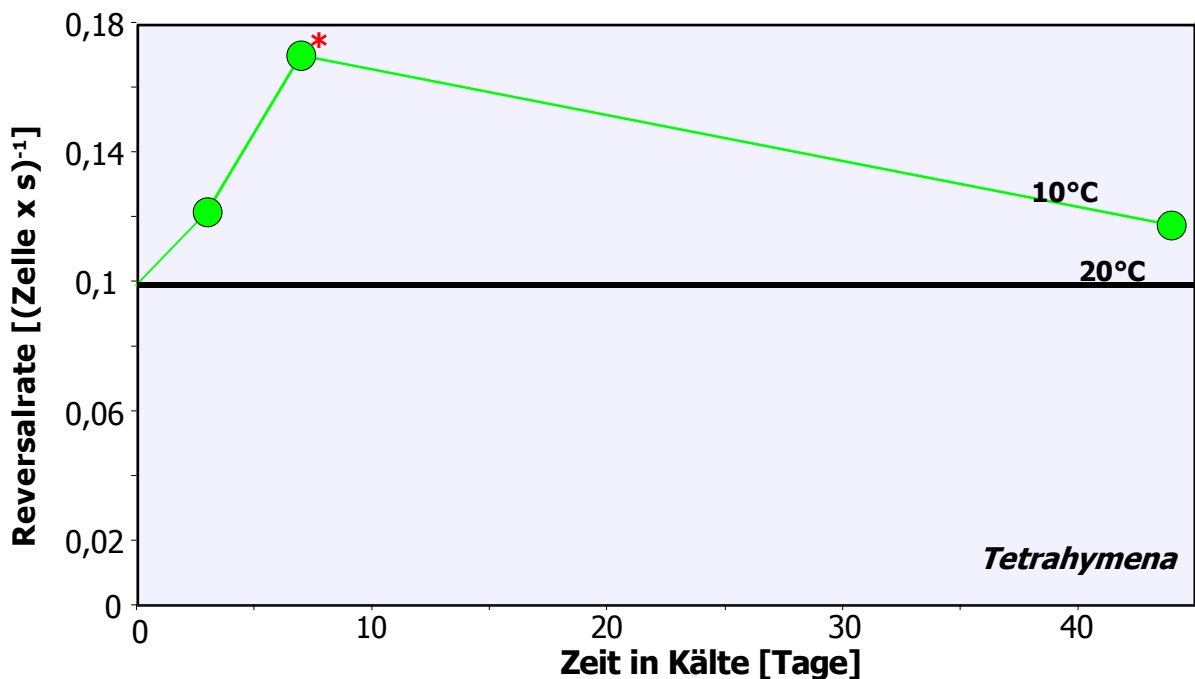


Abb. 13: Reversalfrequenz von *Tetrahymena* bei der Kultivierung in niedriger Temperatur im Vergleich zur Haltung in Raumtemperatur ($20^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ = Kontrolle (schwarze Linie)); (grün = 10°C). Die Reversalfrequenz steigt in den ersten Tagen in niedriger Temperatur deutlich an. In der Langzeitkultur fällt der Wert wieder fast auf das Ausgangsniveau ab. ($N \geq 500$ Zellen/Messpunkt) (* = signifikanter Unterschied)

Um einen Effekt der Viskositätsänderung verschieden temperierter Kulturmedien auf das Verhalten der Ciliaten, speziell deren Sedimentationseigenschaften auszuschließen, wurde die Viskosität der entsprechenden Medien bei den verschiedenen Temperaturen im Vergleich zu Wasser bestimmt. Beide Kulturmedien ändern ihre Viskosität in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Änderung ist dabei im Vergleich mit der Viskosität von Wasser nur geringfügig höher (Abb. 14).

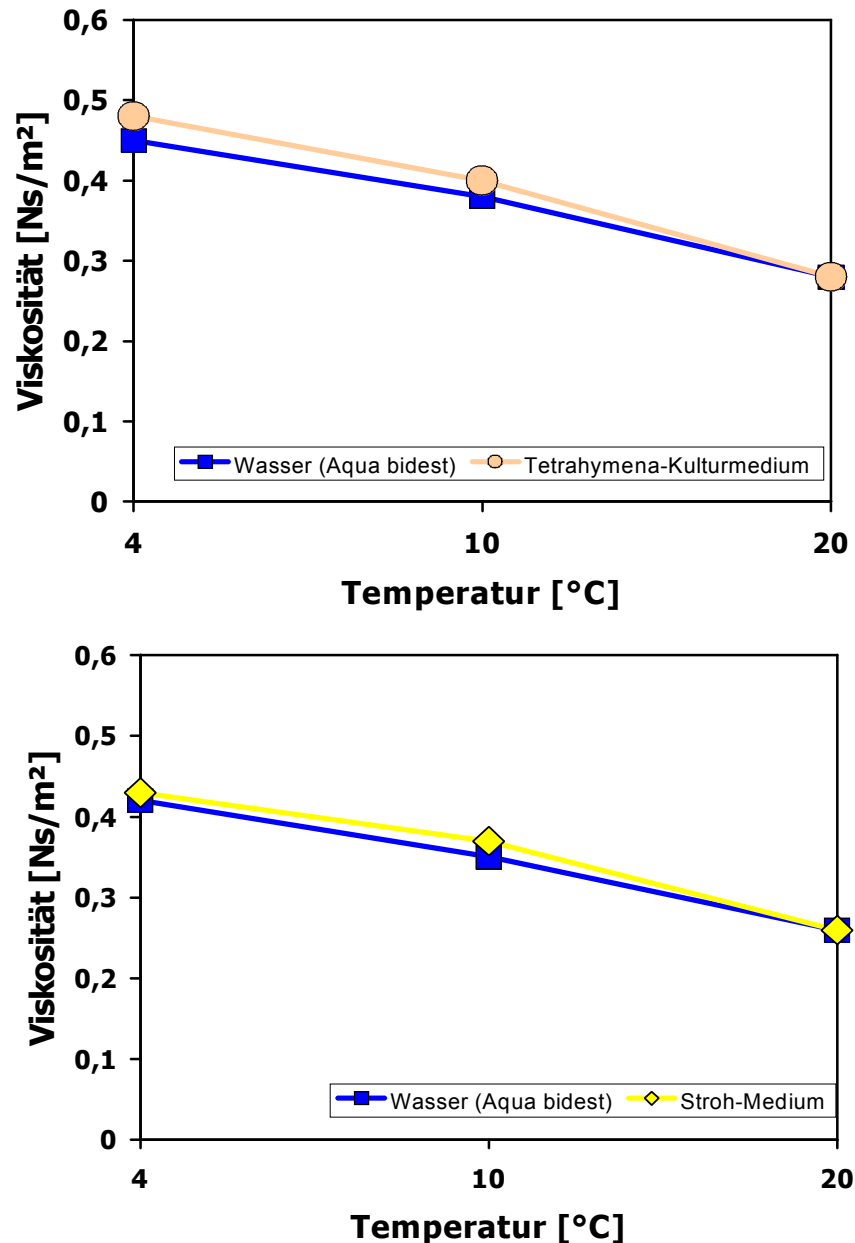


Abb. 14: Viskosität der beiden Kulturmedien im Vergleich zu Wasser (Aqua bidest). Bei der Messung wurden zwei baugleiche Kapillar-Viskosimeter verwendet. Die Daten der Kulturmedien sind jeweils direkt mit der darunterliegenden Darstellung der Aqua bidest-Werte vergleichbar. (Messwiederholungen: N = 10)

Um abzuschätzen, ob durch die leichte Veränderung der Viskosität der Kulturmedien ein Einfluss auf die Zellen bzw. deren Schwimmen ausgeübt werden könnte, wurde mit Hilfe der Stokes'schen Formel [$F_R = 6 \times \pi \times \eta \times r \times v$] (s. 2.2.1.) die Kraft berechnet, die bei der Sedimentation auf die Zellen wirkt. Die dabei errechneten Unterschiede zwischen 20°C und den niedrigeren Temperaturen sind vernachlässigbar klein (Differenzen: *Tetrahymena* $1,13 \times 10^{-7}$ N (10°C); *Paramecium* $2,4 \times 10^{-6}$ N (10°C), $5,65 \times 10^{-7}$ N (4°C)).

3.3. Ergebnisse der morphologischen Untersuchungen der Kältekulturen von *Paramecium* und *Tetrahymena*

3.3.1. Elektronenmikroskopische Darstellung der Ciliaten

Bei den elektronenmikroskopischen Vergleichsstudien der Morphologie von Zellen aus den unterschiedlichen Untersuchungstemperaturen konnten bei *Tetrahymena pyriformis* auffällige ultrastrukturelle Veränderungen dokumentiert werden. Diese Veränderungen betrafen vor allem die Lipideinlagerungen im Cytoplasma der Einzeller. Erste Veränderungen traten nach 3 Tagen in 10°C auf. Während in 20°C keine oder höchstens sehr vereinzelt kleine Lipidtropfen (max. ca. 1 µm) zu finden waren (Abb. 15), waren diese in 10°C nach 3 Tagen deutlich größer geworden (Durchmesser ca. 3 µm) (Abb. 16). Nach 40 Tagen war zusätzlich die Anzahl der Fetttropfen im Cytoplasma stark angestiegen. Bei vielen Zellen hatten sich die Speicherlipidtropfen weiter vergrößert (Durchmesser ca. 7 µm) (Abb. 17). Das Cytoplasma der 10°C-Zellen wirkte zudem deutlich granulöser.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung weiterer wichtiger Zellstrukturen zeigte im Vergleich der verschiedenen Kultivierungstemperaturen keine Unterschiede. So war weder die Struktur noch die Größe der Mitochondrien verändert. Das konnte auch für die Querschnitte der Cilien festgestellt werden, die das normale 9+2-Muster zeigten. Ebenso waren das Mundfeld und dessen Cilienmuster unverändert. Beides stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Zellen auch in der niedrigen Temperatur mobil waren und Nahrung aufnehmen konnten.

Paramecien aus den verschiedenen Kultivierungstemperaturen zeigten auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen im Gegensatz zu *Tetrahymena*-Zellen keine Veränderungen der Menge und Größe der Lipideinlagerungen. Auf den Schnittbildern waren keine Lipidtropfen zu sehen (Abb. 18, 19).

3.3.2. Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Neutrallipide bei Ciliaten

Die in den elektronenmikroskopischen Schnittbildern vorgefundenen Ergebnisse sollten mit Hilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie an intakten Zellen dreidimensional dargestellt werden. Für die Abbildungen 20 bis 24 wurden Beispiele aus optischen Scanserien, die die Zellen vollständig dreidimensional erfassen, ausgewählt.

Die dreidimensionale Darstellung der Lipidtropfenverteilung im Cytoplasma der *Tetrahymena*-Zellen bestätigte die elektronenmikroskopischen 2-dimensionalen Befunde. In den bei üblichen Laborbedingungen kultivierten Zellen (20°C) waren im gesamten Zellkörper keine oder nur sehr wenige und kleine Fetttropfen zu finden. Bei den in Kälte kultivierten Ciliaten waren die Veränderungen dagegen sehr auffällig. Die starke Vergrößerung und die größere Zahl der Lipidtropfen traten in der dreidimensionalen Darstellung besonders deutlich hervor. Dabei zeigte sich aber kein erkennbares Verteilungsmuster in der Zelle (Abb. 20, 21, 22).

Untersuchungen mittels Laserscanning ermöglichten auch bei *Paramecium* die Darstellung von Veränderungen der cytoplasmatischen Lipideinlagerung bei verschiedenen Temperaturen, die in der elektronenmikroskopischen Darstellung nicht erfasst werden konnten (vgl. Abb. 18, 19). Die dreidimensionale Abbildung zeigte für die 20°C-Zellen sehr fein verteilte, aber durch die Fluoreszenz deutlich erkennbare Lipideinlagerungen (Abb. 23). Diese waren noch um einiges kleiner als bei den *Tetrahymena*-Zellen in 20°C. Die Lipidtropfen waren bei *Paramecium* distinkt an beiden Polen der Zellen gelagert und sehr zahlreich. Bei den Kältekulturen traten auch hier wie bei *Tetrahymena* deutliche Veränderungen bzgl. der Menge der Fetttropfen auf. Anders als bei *Tetrahymena* verschwanden die

Lipidtropfen bei *Paramecium* bei einer Langzeithaltung in 10°C und 4°C nahezu vollständig (Abb. 24).

Wie die Dichtemessungen zeigten, wurde die Gesamtdichte sowohl der *Tetrahymena* wie auch der *Paramecium*-Zellen von der veränderten Menge der Lipidtropfen nicht beeinflusst.

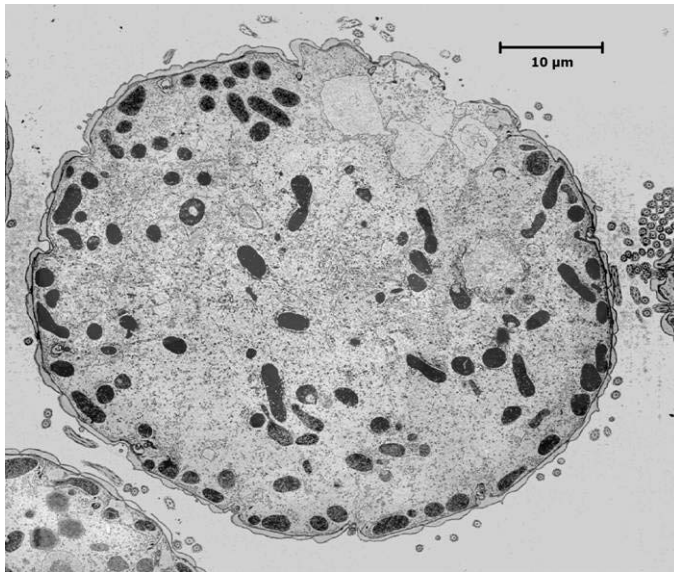


Abb. 15: *Tetrahymena pyriformis* bei 20°C: In den elektronenmikroskopischen Aufnahmen sind nur sehr wenige und sehr kleine Lipidtropfen zu erkennen (erkennbar an der unregelmäßigen Form).

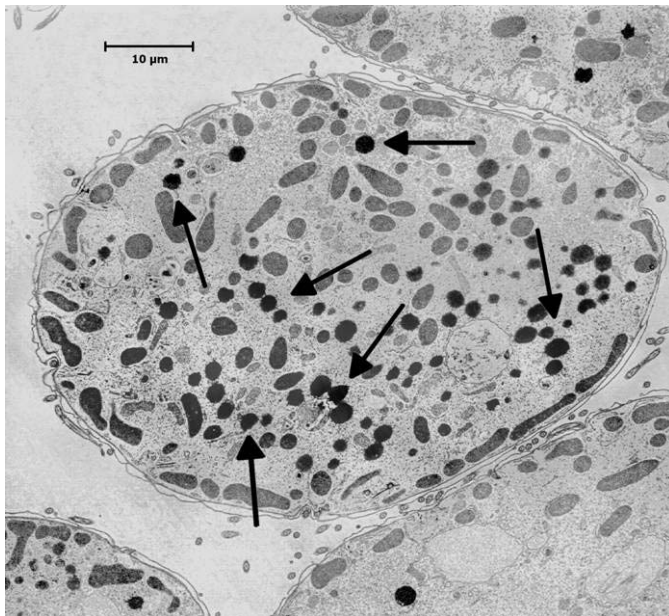


Abb. 16: *Tetrahymena pyriformis* nach drei Tagen bei 10°C: Einzelne Lipidtropfen heben sich in der elektronenmikroskopischen Darstellung deutlich ab und sind gegenüber der Kontrolle in Abb. 15 vergrößert (Pfeile).

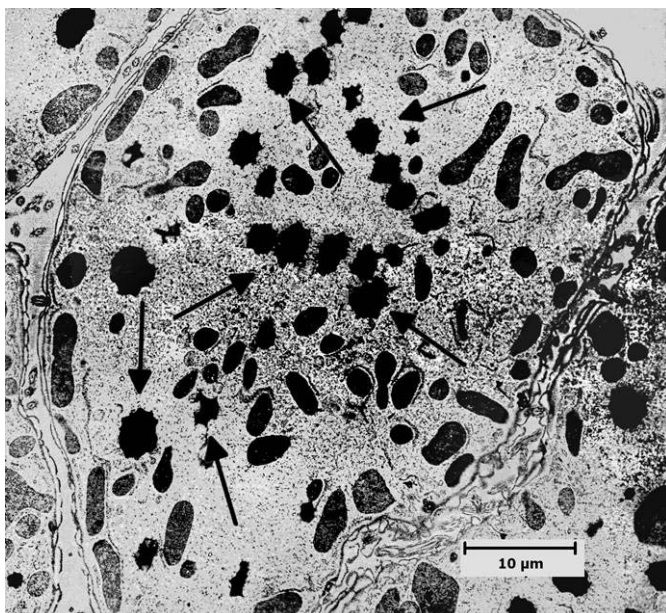


Abb. 17: *Tetrahymena pyriformis* nach 40 Tagen bei 10°C: Im elektronenmikroskopischen Bild hat die Menge der Lipidtropfen deutlich zugenommen. Die Tropfen haben sich zudem weiter vergrößert (Pfeile).

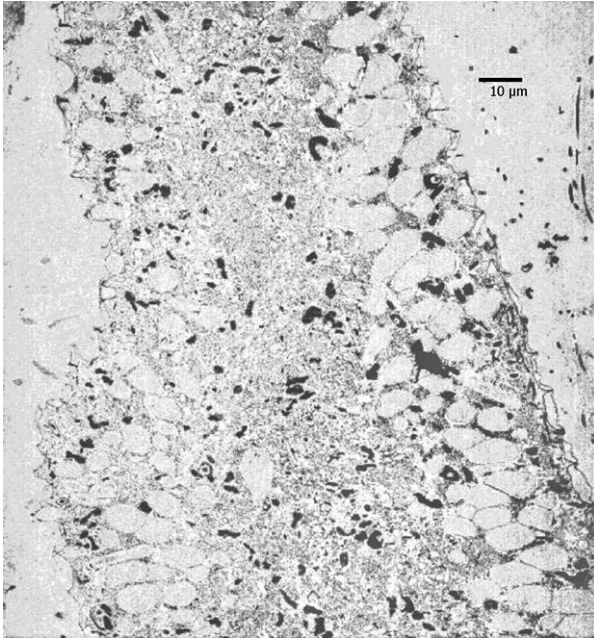


Abb. 18: *Paramecium biaurelia* bei 20°C: Lipideinlagerungen sind in der elektronenmikroskopischen Darstellung von *Paramecium*-Zellen nicht zu erkennen.

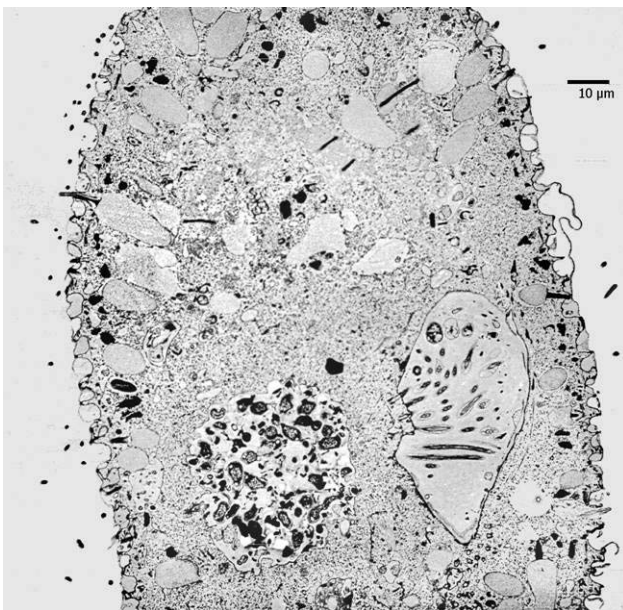


Abb. 19: *Paramecium biaurelia* bei 10°C: Das elektronenmikroskopische Bild lässt auch in 10°C keine Lipidtropfen bei der Langzeitkultivierung in niedriger Temperatur erkennen.

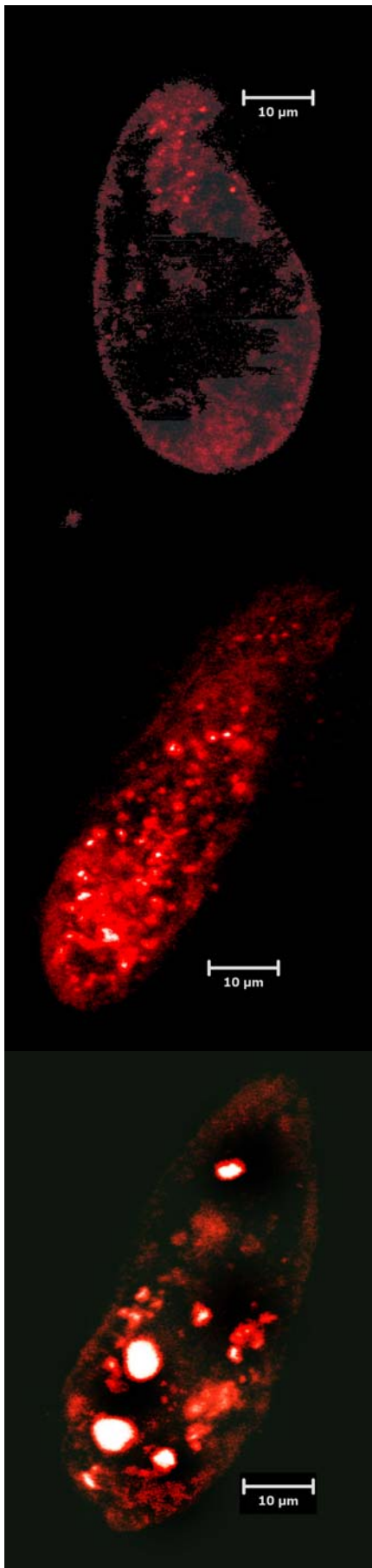


Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Lipideinlagerung bei *Tetrahymena pyriformis* durch Färbung mit Nilrot. Bei 20°C enthält die Zelle kaum Lipideinlagerungen und erscheint daher nahezu dunkel.

Abb. 21: *Tetrahymena pyriformis* nach drei Tagen bei 10°C: Die Färbung mit Nilrot zeigt in der Zelle viele kleine stark leuchtende Lipideinlagerungen. Diese liegen verteilt in der gesamten Zelle.

Abb. 22: *Tetrahymena pyriformis* nach 40 Tagen bei 10°C: Die fluoreszenzmikroskopische Darstellung mit Nilrot zeigt große stark leuchtenden Tropfen, die die Zelle ohne erkennbares Verteilungsmuster ausfüllen.

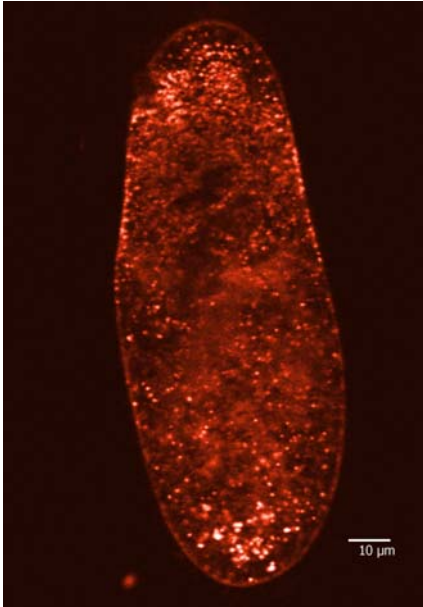


Abb. 23: *Paramecium biaurelia* bei 20°C nach der Färbung mit Nilrot: Deutlich ist eine distinkte Verteilung sehr feiner Lipidtropfen in der Zelle zu erkennen. Die Tropfen befinden sich hauptsächlich an den beiden Polen der Zelle.

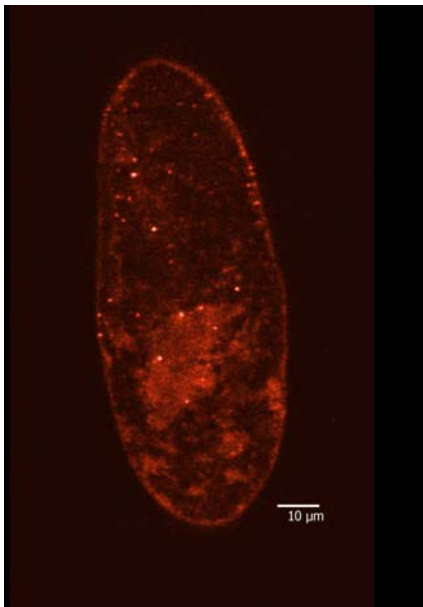


Abb. 24: *Paramecium biaurelia* bei 10°C: Im fluoreszenzmikroskopischen Bild sind nur noch sehr wenige Lipidtropfen in der Zelle zu beobachten, die Fluoreszenz ist fast vollständig verschwunden. Die Zelle erscheint nahezu dunkel. In 4°C sind identische Veränderungen zu beobachten – auf eine Darstellung wurde daher verzichtet.

3.3.3. Darstellung der Formfaktoren Zellfläche und Achsenverhältnis der Ciliaten

Zur Untersuchung der Zellform bzw. deren Veränderung in den unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen wurden die Längenverhältnisse der Zellachsen, die Fläche der Zellen und das Verhältnis der Längsachse zur Fläche der Zellen vermessen (s. 2.2.3.2.).

Die Untersuchungen ergaben bei *Paramecium* Veränderung des Achsenverhältnisses und der Fläche der Zellen während der Kältekultur (Abb. 15a-15c). Die Ergebnisse im Einzelnen:

In 10°C nahm der Verhältniswert der beiden Zellachsen zueinander (Längs- zu Querachse) im Laufe der Expositionsdauer in der Kälte um 13% von 0,297 auf 0,336 zu, d.h. es fand eine Abrundung der Zellen statt, ohne dass aber die längliche Zellform verloren ging. Während sich der Wert nach 2 Tagen in 10°C noch nicht signifikant vom 20°C-Wert unterschied, zeigte sich nach 7 Tagen in 10°C eine Tendenz zur Abrundung, die ab 14 Tagen sehr deutlich ausgeprägt war.

In 4°C nahm der Verhältniswert der Achsen zunächst zu (von 0,297 (Kontrollwert) auf 0,362 nach 20 Tagen in 4°C), fiel dann aber bei der Langzeitkultivierung in dieser Temperatur wieder leicht ab. Nach einer anfänglichen leichten Tendenz zur Abrundung kam es also in dieser Phase zu einer Verschlinkung der Zellen. Die an der y-Achse aufgetragenen Ellipsoide geben einen groben Eindruck der Formveränderung.

Durch die Analyse mittels Bildverarbeitung und der Ermittlung der Flächen- und Längenparameter stellte sich die Veränderung der „Zellfläche“ (= Maß für die Größe der Zellen) und des Fläche-Länge-Verhältnisses deutlicher dar. Während sich in 10°C (durchschnittlich 304 μm^2 / Tag 7) zunächst keine signifikante Änderung gegenüber der 20°C-Kontrolle (durchschnittlich 302 μm^2) zeigte, konnte in 4°C eine kurzfristige Zunahme auf 338 μm^2 in 4°C (Tag 7) gemessen werden. In der Langzeithälterung bei niedrigen Temperaturen zeigte sich in beiden

Temperaturen dann eine ausgeprägte Abnahme der Schnittfläche auf durchschnittlich $132 \mu\text{m}^2$ (10°C) bzw. $119 \mu\text{m}^2$ (4°C) (Fig. 25b).

Die Veränderungen des Verhältnisses von Fläche zu Längsachse tendieren in die gleiche Richtung. Die Größenverhältnisse der Zellen änderten sich in 4°C stärker als in 10°C . Diese Beobachtung gilt sowohl für die erste Flächenzunahme von nur $0,08 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ in 10°C (Tag 14) gegenüber $0,34 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ in 4°C (Tag 20), als auch für die Abnahme in der Langzeithälterung um $1,43 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ in 4°C gegenüber $1,35 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}$ in 10°C . Die beobachteten Unterschiede waren nur in der Abnahme während der Langzeithälterung signifikant. Das heißt, die *Paramecium*-Zellen werden im Laufe der Langzeitkultivierung in der Kälte wesentlich kleiner und dünner.

Für Abb. 25 und Abb. 26 gelten:

Kontrolle: 20°C .

Kurzzeit: bei *Paramecium* 2 bzw. 7 Tage in 10°C , 3 Tage in 4°C ; bei *Tetrahymena* 3 Tage in 10°C , 1 Tag in 4°C .

Mittlere Expositionsdauer: bei *Paramecium* 14 Tage in 10°C , 20 Tage in 4°C ; bei *Tetrahymena* 7 Tage in 10°C .

Langzeit: bei *Paramecium* 99 Tage in 10°C , 106 Tage in 4°C ; bei *Tetrahymena* 40 Tage in 10°C .

In 10°C wurden zur Darstellung der kurzzeitigen Veränderungen bei *Paramecium* die Daten von Tag 2 und Tag 7 aufgetragen.

N > 200

Kontrolle 

Kurzzeit 

mittlere Expositionsdauer 

Langzeit 

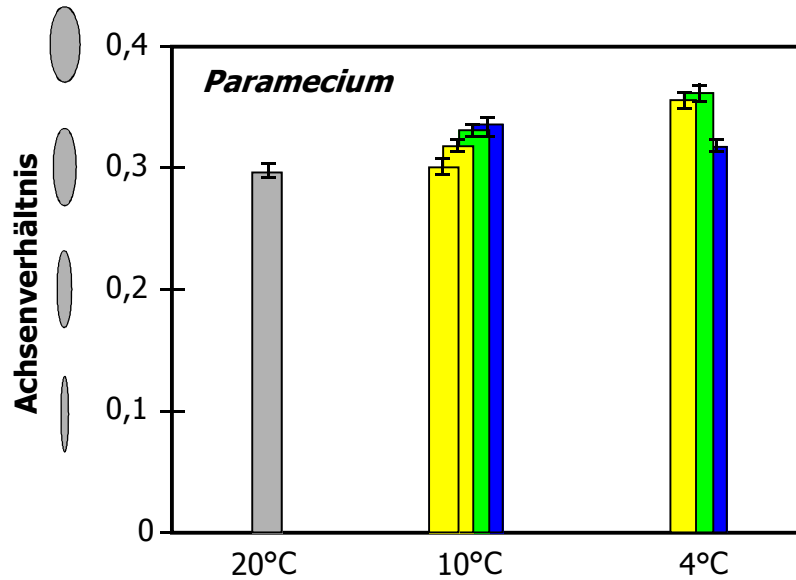


Abb. 25a: Achsenverhältnis (Längsachse/Querachse) von *Paramecium*-Zellen in Abhängigkeit von Kultivierungstemperatur und -dauer. Die Zellen zeigen während der Kältekultivierung eine leichte Tendenz zur Abrundung ($N \geq 500$).

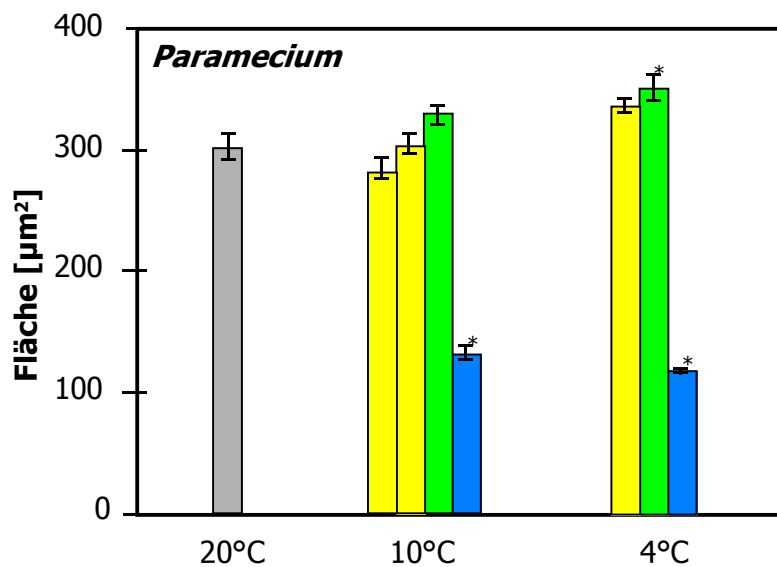


Abb. 25b: Änderung der Schnittflächen von *Paramecium* in Abhängigkeit von Kultivierungstemperatur und -dauer. Die Fläche der Zellen nimmt in der Kälte zunächst zu und dann bei längerer Kältekultivierung stark ab. (* = signifikante Veränderung) ($N \geq 500$).

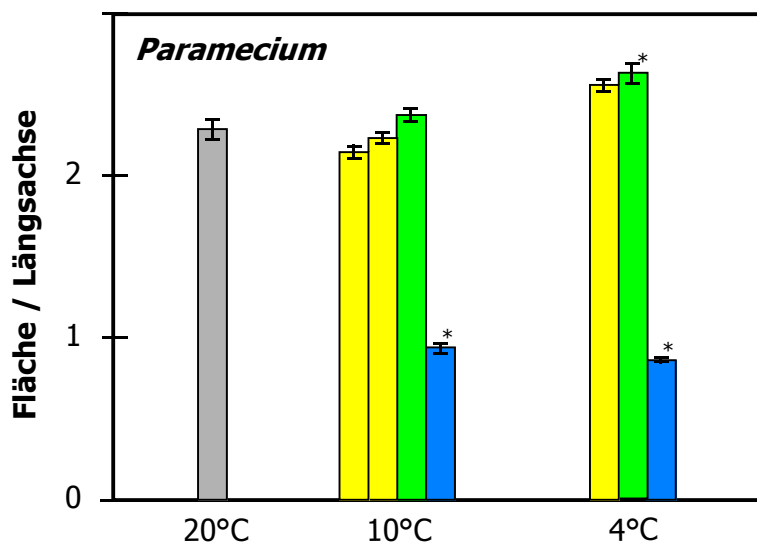


Abb. 25c: Verhältnis von Fläche zu Längsachse ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) der *Paramecium*-Zellen in Abhängigkeit von Kultivierungstemperatur und -dauer. Diese Parameterkombination zeigt ähnliche Tendenzen wie auch die reinen Flächenveränderungen (* = signifikante Veränderungen) ($N \geq 500$).

Deutlich wurden die Veränderungen auch in einer Verschiebung der Klassenhäufigkeitsverteilungen der einzelnen Formparameter. Die Verteilung der Häufigkeiten der Achsenverhältnisse zeigte in beiden Temperaturen eine abgestufte Verschiebung der Werte zu insgesamt runderen Zellen. Die Veränderung war aber nicht bei allen Zellen einer Kultur gleich stark, so dass sich die Klassen der verschiedenen Temperaturen mehr oder weniger stark überlagerten. Bei den Messwerten der 4°C-Kulturen war die Verschiebung stärker ausgeprägt und spiegelte auch die rückläufige Entwicklung während der Langzeitkultivierung wider. Deutlich waren bei 20°C wie auch bei Langzeitkultivierung zweigipflige Verteilungen der Werte.

Die Klassenhäufigkeitsverteilungen der Flächenwerte der Zellen zeigten ebenfalls eine deutliche Verschiebung; zunächst waren vor allem größere Zellen und nach einer Adaptationszeit wieder eine zweigipflige Verteilung der Zellgröße in den Kältekulturen zu finden. In der Langzeitkultivierung wurden die Zellflächen wieder sehr viel einheitlicher und die Verteilung verschob sich insgesamt nach links zu kleineren Werten. Diese Gesamttendenzen waren in beiden Temperaturansätzen zu beobachten, wobei die Effekte in der niedrigeren Temperatur immer eindeutiger ausgeprägt waren.

Bei *Tetrahymena* waren Veränderungen der Werte von Achsenverhältnissen und Fläche ebenfalls zu erkennen. Im Achsenverhältnis (Längs- zu Querachse) zeigte sich auch bei *Tetrahymena* eine Tendenz zur Abrundung, wie sie auch schon bei *Paramecium* zu beobachten war (Abb. 26a).

Die Abrundung der *Tetrahymena*-Zellen, die von der Grundform her rundlicher sind als *Paramecium*, war deutlicher ausgeprägt. Der Verhältniswert nahm mit der Zeit in der Kälte vom Faktor 0,545 in 20°C zu 0,679 in der 10°C-Langzeitkultur zu. Anders als bei *Paramecium* kehrte sich dieser Prozess in der Langzeitkultur also nicht um. In 4°C überlebte *Tetrahymena* nur einen Tag, dabei zeigte sich die jedoch ebenfalls eine Tendenz zur Abrundung, wobei sie mit einem Faktor von 0,620 etwas stärker war als in der nur wenig älteren Kultur in 10°C (Faktor 0,559)

(Abb. 26a). *Tetrahymena* zeigte jedoch im Vergleich zu *Paramecium* eine wesentlich einheitlichere Klassenverteilung ohne ausgeprägte Zweigipfligkeit.

Die Darstellung der Zellflächen in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur gab die insgesamt stärkeren Größenveränderungen von *Tetrahymena* im Vergleich zu *Paramecium* wieder. Die Zellen erreichten nach einer mittleren Expositionsdauer von 7 Tagen in 10°C die größte Fläche (191 μm^2). Danach sank der Wert in der Langzeitkultivierung (bis zu 40 Tage) wieder um durchschnittlich 24 μm^2 auf 167 μm^2 ab. Dieser Wert lag aber immer noch um +74 μm^2 über dem 20°C-Wert von 93 μm^2 . In 4°C waren die Einzeller schon nach dem ersten Tag stark vergrößert. Der Wert von durchschnittlich 214 μm^2 übertraf die maximale Vergrößerung in 10°C deutlich (Abb. 26b).

Die Untersuchung der Klassenhäufigkeitsverteilungen verdeutlichte diese Tendenzen noch einmal: Während bei *Paramecium* in 20°C eine zweigipflige Verteilung zu beobachten war, trat diese bei *Tetrahymena* erst nach einer längeren Kultivierung in 10°C auf. In 20°C zeigten die *Tetrahymena*-Kulturen, die sich in einer stationären Wachstumsphase befanden, eine sehr einheitliche Größenverteilung. Die Größenverschiebung der Flächen trat zudem bei dem kleineren Einzeller (*Tetrahymena*) viel früher auf und war ausgeprägter.

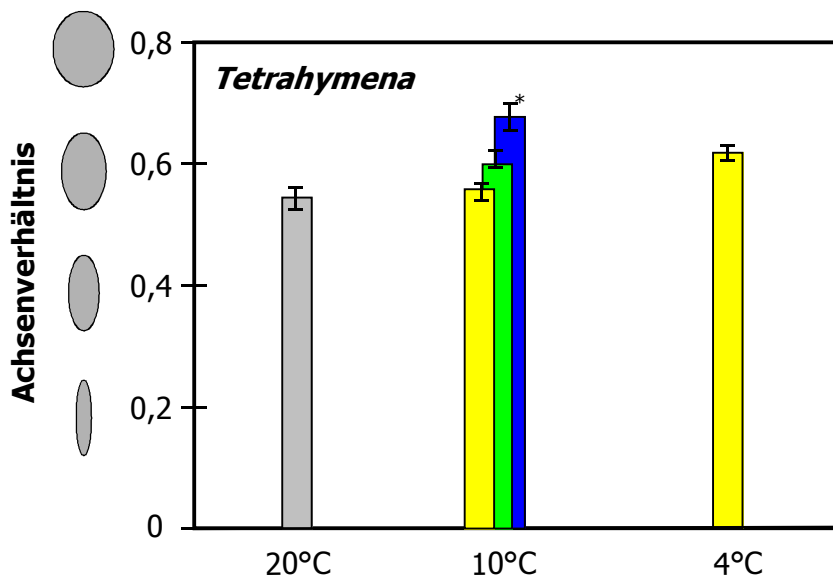


Abb. 26a: Achsenverhältnis (Längs- zu Querachse) von *Tetrahymena*-Zellen in Abhängigkeit von Kultivierungstemperatur und -dauer. Das Achsenverhältnis der Zellen nimmt in der Langzeitkultur in 10°C deutlich zu. (* = signifikante Veränderungen) ($N \geq 500$)

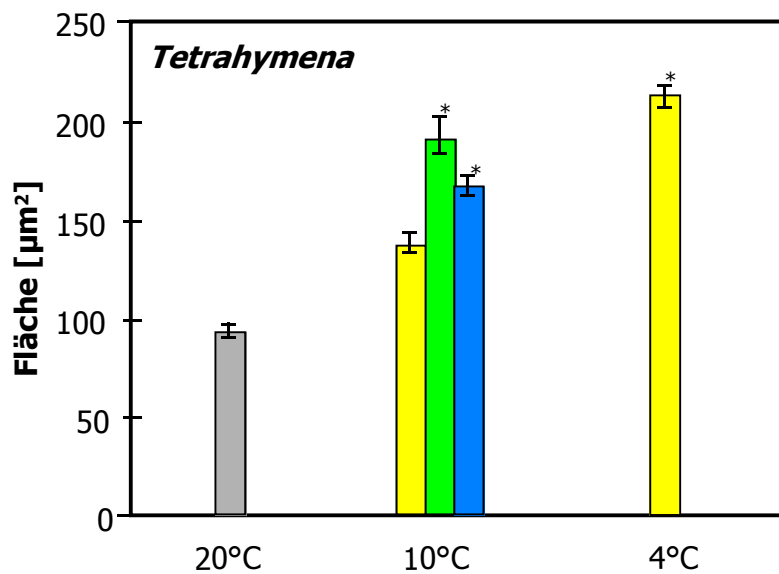


Abb. 26b: Flächenänderung in der 2-dimensionalen Ansicht von *Tetrahymena*-Zellen in Abhängigkeit von Kultivierungstemperatur und -dauer. Die Fläche der Ciliaten steigt in beiden Kältekulturen deutlich an. (* = signifikante Veränderung) ($N \geq 500$)

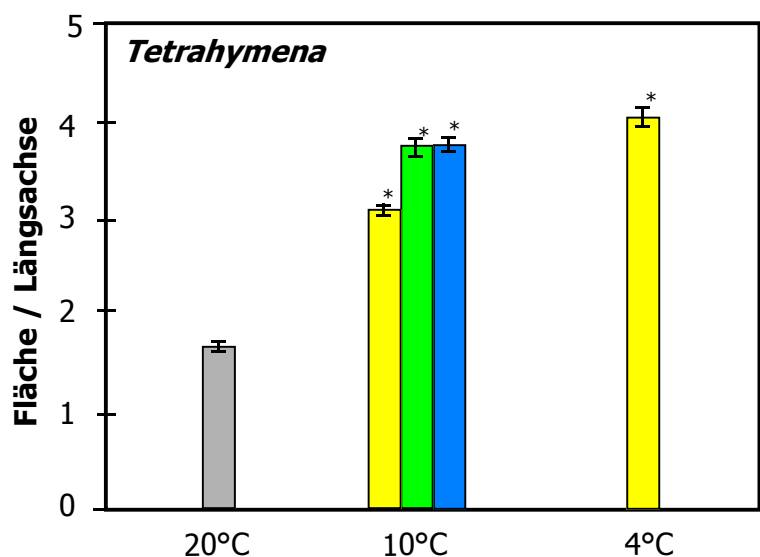


Abb. 26c: Verhältnis von Fläche zu Längsachse ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) der *Tetrahymena*-Zellen in Abhängigkeit von Kultivierungstemperatur und -dauer. Die Veränderung der Parameterkombination in der Kältekultur ist noch deutlicher ausgeprägt als die Veränderung der Fläche allein. (* = signifikante Veränderung) ($N \geq 500$)

3.4. Ergebnisse der biochemischen Untersuchungen

3.4.1. Einfluss der Kultivierungstemperatur und –dauer auf die 5`Methoxy-Tryptamin- und Melatoninkonzentrationen der Ciliaten

Die cytoplasmatischen Konzentrationen der Indolamine Melatonin bzw. 5`Methoxy-Tryptamin sind bei Ciliaten Parameter, die auf eine Veränderung der Physiologie durch Temperaturschwankungen hinweisen.

In der Darstellung der 10°C-Werte (Abb. 27a, blau) waren ähnliche Schwankungen der Konzentrationen zu sehen wie bei den 20°C-Werten (rot). Die Trendlinien verdeutlichen eine Abnahme der 5`Methoxy-Tryptamin-Konzentration im Verlauf von 24 Stunden bei beiden *Paramecium*-Kulturen um etwa den Faktor 2 bei 20°C und den Faktor 3 bei 10°C.

Die Messung der Indolamin-Konzentrationen in Langzeit-Kältekulturen zeigte eine deutliche Veränderung gegenüber 20°C-Kulturen: die gemessene Gesamtkonzentration des 5`Methoxy-Tryptamin nahm ab. Die Trendlinie verläuft ähnlich wie die 20°C-Trendlinie, ist aber parallel nach unten versetzt und um durchschnittlich 1×10^{-2} ng/mg Protein niedriger (Abb. 27a). Die leichten Schwankungen der Konzentrationskurve in 20°C während des Tages wiederholten sich auch in 10°C in ähnlicher Weise.

Melatonin ließ sich bei *Paramecium* nur in einer 20°C-Probe um 22:00 Uhr messen. Hier war Melatonin in den permanenten Dunkelkulturen mit $3,2 \times 10^{-3}$ ng/mg Protein nachzuweisen. In den in Kälte kultivierten Zellen war zu keinem Zeitpunkt Melatonin nachweisbar (Abb. 27b).

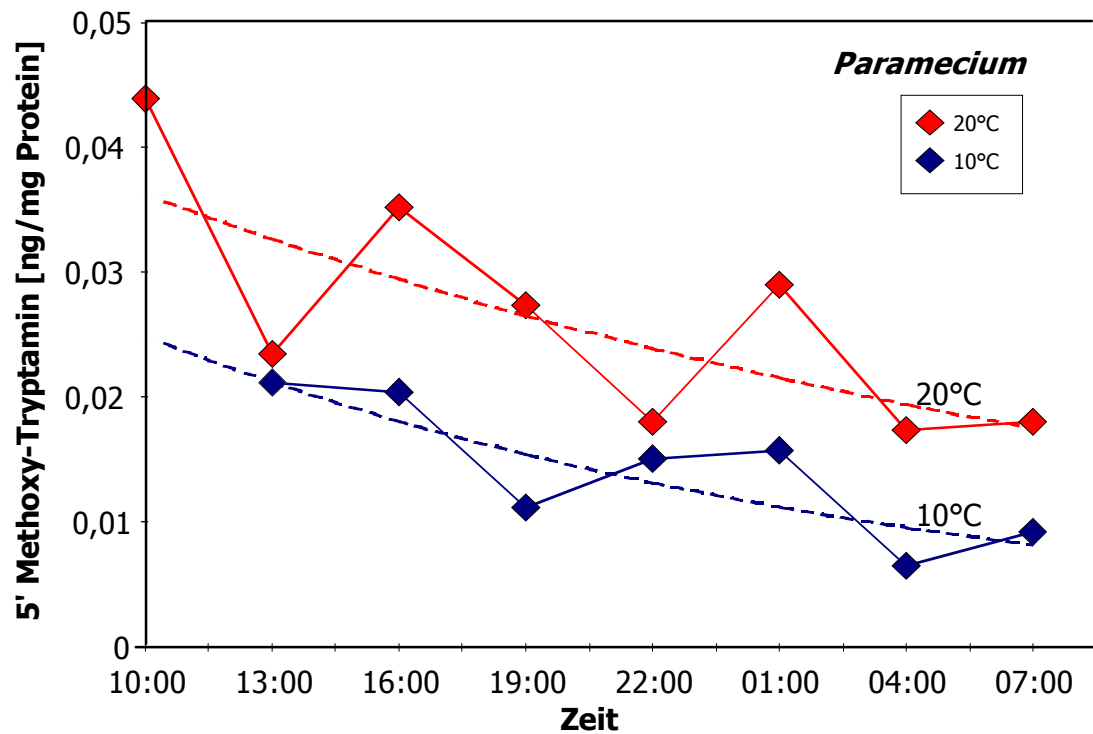


Abb. 27a: 5' Methoxy-Tryptamin-Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur bei *Paramecium*. In 20°C und 10°C ist über den gesamten Tagesverlauf eine deutliche Abnahme der Konzentration zu beobachten. (N = 1)

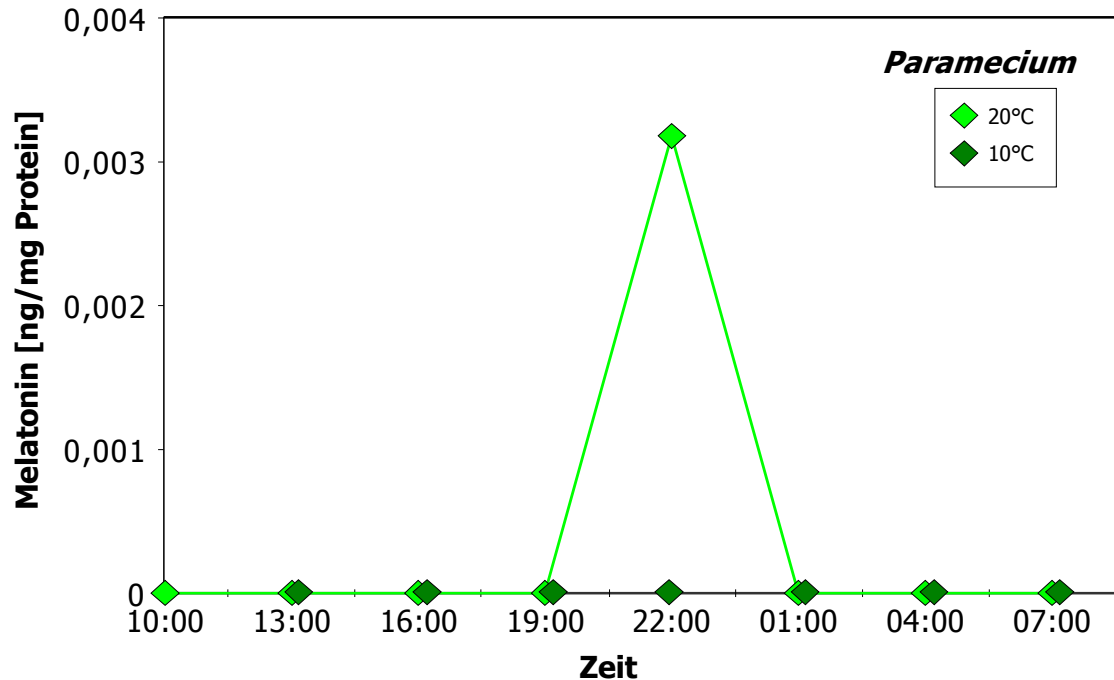


Abb. 27b: Melatonin-Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur bei *Paramecium*. Während Melatonin in 20°C zu einem Zeitpunkt nachgewiesen werden konnte, wurde die Melatoninproduktion in 10°C eingestellt. (N = 1)

Die Konzentration von 5-Methoxy-Tryptamin bei *Tetrahymena* war etwas niedriger als bei *Paramecium* (max. $2,0 \times 10^{-2}$ ng/mg Protein gegenüber durchschnittlich zwischen $2,5 \times 10^{-2}$ und $4,0 \times 10^{-2}$ ng/mg Protein). Anders als *Paramecium* zeigte *Tetrahymena* in 20°C keine Schwankungen während der 24h-Messung, sondern lediglich einen mehr oder weniger kontinuierlichen Abfall der Indolaminkonzentration über den gesamten Beobachtungszeitraum hinweg von $2,2 \times 10^{-2}$ ng/mg Protein um 10:00 Uhr zu $3,3 \times 10^{-2}$ ng/mg Protein um 4:00 (Abb. 27c). Die größte Änderung konnte dabei zwischen 16:00 Uhr und 19:00 Uhr mit einem Abfall von $1,6 \times 10^{-2}$ ng/mg Protein auf $4,4 \times 10^{-3}$ ng/mg Protein gemessen werden.

In der niedrigen Kultivierungstemperatur von 10°C nahm die Gesamtkonzentration an 5-Methoxy-Tryptamin wie auch bei *Paramecium* ab. Die Reduktion war jedoch besonders während der Tagesstunden deutlich ausgeprägt. Die Konzentration sank hier am höchsten Punkt der Kurve um etwa den Faktor 7 gegenüber den 20°C-Werten. Der Wert lag in der niedrigen Temperatur nie über 6×10^{-3} ng/mg Protein. Ein 24h-Verlauf wie in 20°C war bei *Tetrahymena* nicht zu beobachten.

Melatonin konnte in *Tetrahymena* bei 20°C zu jeden Messzeitpunkt nachgewiesen werden (Abb. 27d). Die Konzentrationen schwankten hier zwischen $1,2 \times 10^{-3}$ ng/mg Protein und $1,6 \times 10^{-4}$ ng/mg Protein, zeigten aber keinen regelmäßigen Verlauf. Um 19:00 Uhr zeigte die Konzentrationskurve einen starken Abfall um den Faktor 7. Anders als bei *Paramecium* fand sich auch in den in Kälte kultivierten *Tetrahymena*-Zellen eine geringe aber messbare Melatoninkonzentration. Im Gegensatz zur 20°C-Messung verlief die Konzentrationskurve in der niedrigen Kultivierungstemperatur nahezu ohne Schwankungen über den Zeitraum der Messung. Die Gesamtkonzentration lag dabei mit durchschnittlich 1×10^{-4} ng/mg Protein stets deutlich niedriger als in 20°C. Die starke Konzentrationsänderung von maximal $1,1 \times 10^{-3}$ ng/mg Protein im Vergleich von 20°C zu 10°C wies auch hier auf eine aktive Anpassung der Zellen hin, die mit einer Reduktion der Enzymmenge einhergeht. Die Mengenreduktion von Melatonin betrug in den Maxima der Kurve deutlich über 50%/10°C (87%).

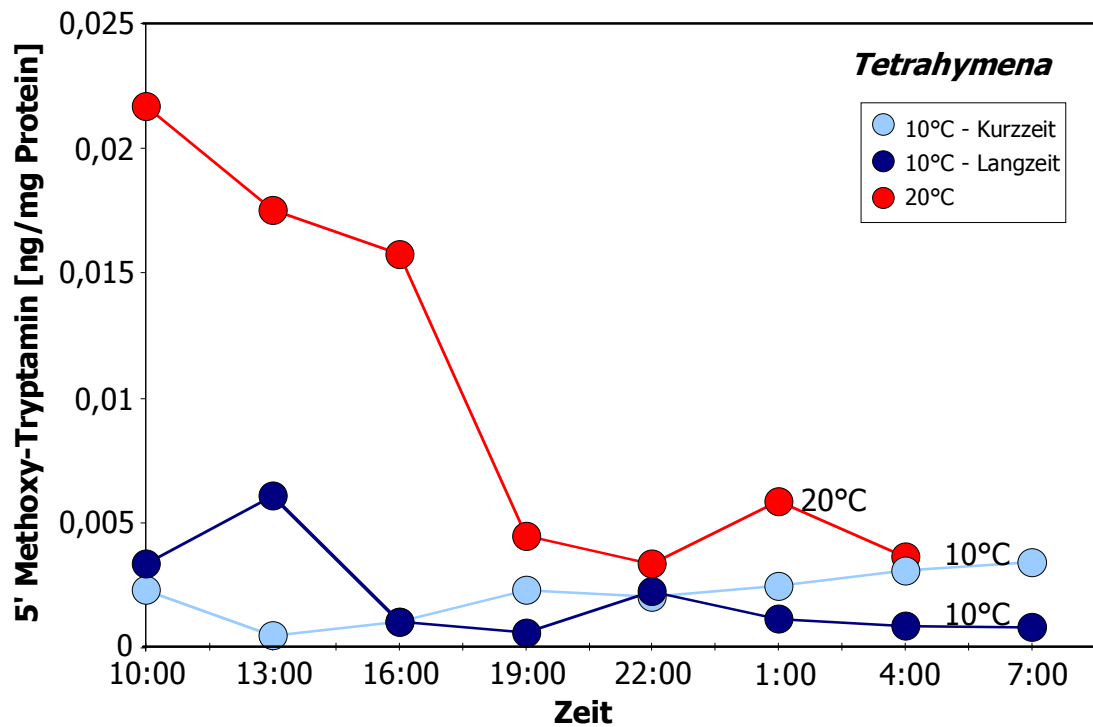


Abb. 27c: 5' Methoxy-Tryptamin-Konzentrationen in *Tetrahymena*-Kulturen über einen Zeitraum von 24 Stunden in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur und -dauer. Die Konzentrationen nehmen in den Kältekulturen deutlich gegenüber den Kulturen aus 20°C ab.

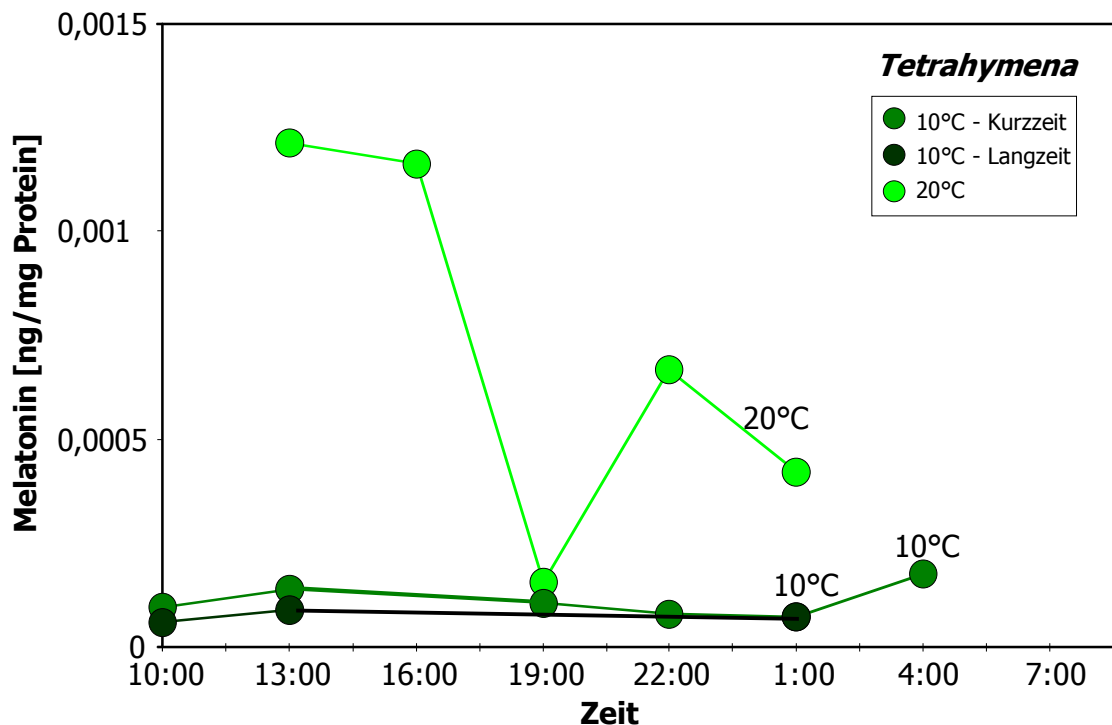


Abb. 27d: Melatonin-Konzentrationen über einen Zeitraum von 24 Stunden in Abhängigkeit von der Kultivierungstemperatur und -dauer bei *Tetrahymena*. Melatonin ist bei *Tetrahymena* über den gesamten Tagesverlauf nachweisbar. In 10°C nimmt die Konzentration stark ab.

3.5. Einfluss von Beschleunigungen auf den Gehalt an sekundären Botenstoffe von Ciliaten

Um biochemische Auswirkungen von Beschleunigungen zu untersuchen und damit einen Hinweis auf die Beteiligung von sekundären Botenstoffen an der Signaltransduktionskette der Graviperzeption zu bekommen, wurden die Konzentrationen von cAMP und cGMP von *Tetrahymena* während Zentrifugation und während des Fluges mit einer Höhenforschungsrakete (TEXUS) untersucht. Die Werte des TEXUS-Fluges wurden zusammen mit parallel erhobenen Werten von *Paramecium* betrachtet und ausgewertet. Das Zeitprofil der Fixierungen der Zellen während der Zentrifugation orientierte sich am Zeitprofil des TEXUS-Fluges (s. Tab.5). Die Startbeschleunigung der Rakete, bei der die Zellen einer hohen g-Zahl ausgesetzt waren, dauerte maximal 10 s an, so dass der erste Fixierungszeitpunkt bei den Zentrifugenversuchen innerhalb dieses Zeitraums (5 s) gewählt wurde.

3.5.1. Einfluss erhöhter Beschleunigungen auf den cAMP-Gehalt von *Tetrahymena*

Bei 3g zeigte sich im cAMP-Spiegel von *Tetrahymena* zu den gewählten Zeitpunkten (s. Tab. 4) keine Veränderung gegenüber der Konzentration unter 1g-Bedingungen. Die cAMP-Konzentration lag bei 1g im Durchschnitt bei 0,51 pmol/mg Protein. Da die letzten beiden Messpunkte aufgrund des gewählten Zeitprofils 5 Minuten auseinanderlagen, bleibt offen, ob im Zeitraum zwischen 5 min und 10 min in Hypergravitation eine Reaktion stattfand, die während der letzten Messung schon wieder abgeklungen war (Abb. 28a). Da die Fixierung der Proben bei laufender Zentrifuge stattfand, sind alle gemessenen Konzentrationen allein von der Reaktion der Zellen auf die erhöhte Beschleunigung bzw. eine Adaptation an diese abhängig. Zwar zeigten sich in 3g nach 5 s und 10 min leichte Anstiege in der Konzentration des sekundären Botenstoffs, diese lagen jedoch im Schwankungsbereich der 1g-Kontrollen zwischen 0,88 pmol/mg Protein und 0,30 pmol/mg Protein und waren nicht signifikant.

Unter 5g-Bedingungen konnte dagegen eine Konzentrationsänderung im cAMP-Gehalt der *Tetrahymena*-Zellen gemessen werden. Der Schwankungsbereich der Messung war jedoch so groß, dass nicht erkennbar ist, ob es sich um eine tatsächliche Veränderung handelt. Nach 5 min in 5g betrug der cAMP-Level 2,4 pmol/mg Protein und lag deutlich über dem Schwankungsbereich der 1g-Kontrolle. Nach 10 min in Hypergravitation war der cAMP-Spiegel auf 0,55 pmol/mg Protein abgesunken (Abb. 28b).

Bei einer Beschleunigung von 9g, die der linearen Startbeschleunigung der Rakete entspricht, konnte zunächst kein Einfluss auf den Gehalt an sekundären Botenstoffen nachgewiesen werden (Abb. 28c). Lediglich am Ende der Messung bei 10 min zeigte sich eine abfallende Tendenz im cAMP-Gehalt. Zu diesem Messzeitpunkt war der Level des sekundären Botenstoffes im Mittel unter den Kontrollwert bei 1g abgefallen (0,23 pmol/mg Protein gegenüber 0,51 pmol/mg Protein bei 1g).

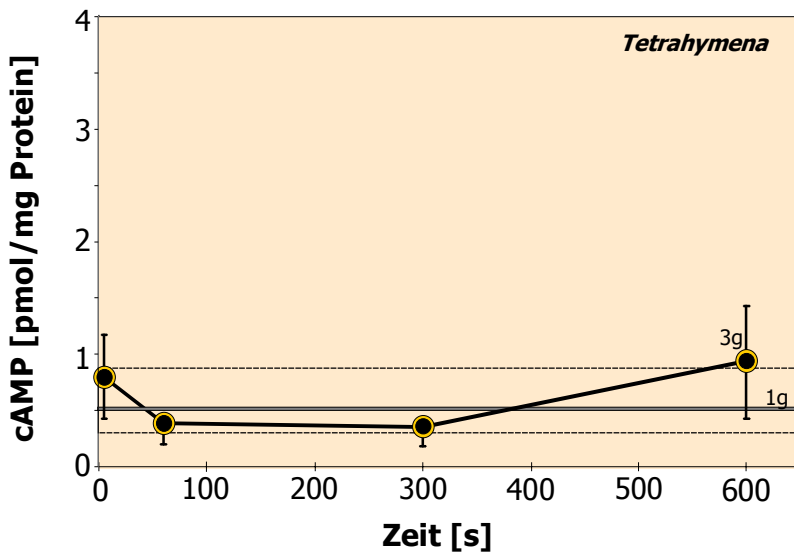


Abb. 28a: cAMP-Konzentration von *Tetrahymena* während der Zentrifugation (3g) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die cAMP-Konzentration unterscheidet sich zu keinem Zeitpunkt signifikant vom 1g-Wert. (1g-Wert: Linien [durchgehend = Mittel, gestrichelt = Konfidenzbereich])

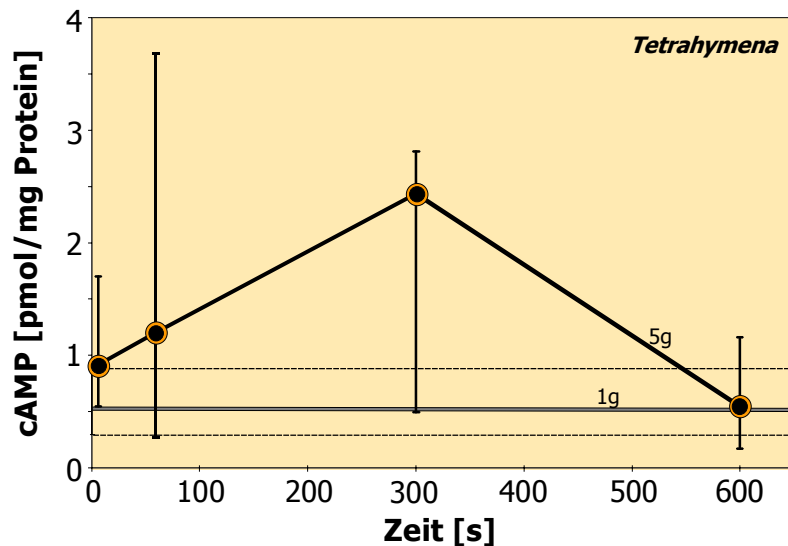


Abb. 28b: cAMP-Konzentration von *Tetrahymena* während der Zentrifugation (5g) zu verschiedenen Zeitpunkten. Nach 5 min wurde eine erhöhte cAMP-Konzentration im Vergleich zu 1g gemessen. Der Konfidenzbereich dieses Messunktes ist jedoch sehr groß, so dass keine eindeutige Aussage getroffen werden kann. (1g-Wert: Linien [durchgehend = Mittel, gestrichelt = Konfidenzbereich])

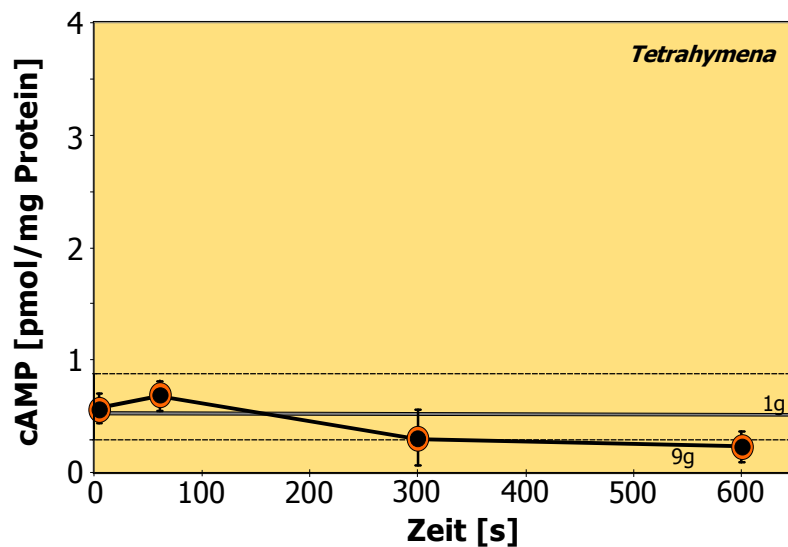


Abb. 28c: cAMP-Konzentration von *Tetrahymena* während der Zentrifugation (9g) zu verschiedenen Zeitpunkten. Die cAMP-Konzentration unterscheidet sich auch hier zu keinem Zeitpunkt signifikant vom 1g-Wert. (1g-Wert: Linien [durchgehend = Mittel, gestrichelt = Konfidenzbereich])

3.5.2. Einfluss von Mikrogravitation auf den Gehalt an sekundären Botenstoffen in *Tetrahymena* und *Paramecium*

Die cAMP-Daten von *Paramecium*, die im Folgenden zum Vergleich mit den *Tetrahymena*-Daten herangezogen wurden, sind bereits in einer von mir mitbetreuten Diplomarbeit von Christiane Stieber (Stieber, 2001) veröffentlicht worden. Zum direkten Vergleich wurde die Darstellung der Daten angepasst.

3.5.2.1. cAMP-Konzentration bei *Tetrahymena*

Bei *Tetrahymena* wurde unter der Einwirkung der Startbeschleunigung der Rakete zunächst keine Veränderung in der cAMP-Konzentration (1g-Ausgangswert: 1,18 pmol/mg Protein [Schwankungsbereich +0,36 bzw. -0,30]) gemessen (Abb. 29a). Dies stimmt mit den Daten aus dem Zentrifugenexperiment bei 9g (s. Abb. 28c) überein. Während der Phase der größten Beschleunigung (+38s, > 9g) blieb der cAMP-Wert noch im Bereich der 1g-Kontrolle (zwischen 1,54 pmol/mg Protein und 0,88 pmol/mg Protein), stieg dann aber bis zum Zeitpunkt +64s nach Abschalten der Triebwerke beim Eintritt in die μ g-Phase (10^{-2} g) deutlich auf 1,83 pmol/mg Protein an. Im weiteren Verlauf der μ g-Phase des Fluges (10^{-4} g) sank die Konzentration von cAMP zunächst wieder in den Bereich der 1g-Kontrolle ab, stieg dann aber bei 185 s erneut an (auf 1,69 pmol/mg Protein). Der Konfidenzbereich dieses Wertes lag zwischen 1,91 pmol/mg Protein und 0,75 pmol/mg Protein und ließ so keine deutliche Abgrenzung vom 1g-Level zu. Erst ab dem Zeitpunkt der vorletzten Messung bei 249s fiel die cAMP-Konzentration unter den durchschnittlichen Wert der 1g-Kontrolle. Die beiden letzten Messwerte lagen jedoch noch im unteren Schwankungsbereich der 1g-Kontrolle. Da weitere Messpunkte nicht vorliegen, war eine abschließende Beurteilung dieser Tendenz nicht möglich.

Bei *Paramecium* stellten sich die Konzentrationsveränderungen während des Flugverlaufs etwas anders dar (Abb. 29b). Zunächst sank die cAMP-Konzentration bei *Paramecium* während der Beschleunigungsphase von etwa 11 pmol/mg Protein (1g-Wert) auf 6,14 pmol/mg Protein ab, entgegengesetzt zu den erhöhten cAMP Werten im Zentrifugenexperiment bei 9g. Im weiteren Verlauf des Fluges zu

Beginn der $10^{-4}g$ -Phase wurde eine kurzfristige Zunahme der cAMP-Konzentration um 2 pmol/mg Protein gegenüber der Beschleunigungsphase gemessen, so dass die Werte wieder annähernd im Schwankungsbereich der 1g-Kontrolle bei etwa 8 pmol/mg Protein lagen. Zum Zeitpunkt der letzten drei Fixierungen sank der cAMP-Wert gegenüber der Kontrolle eindeutig auf durchschnittlich 6,5 pmol/mg Protein ab. Damit lag der Wert etwa 15% unter dem Schwankungsbereich der 1g-Kontrolle.

Der Verlauf der cAMP-Veränderungen während des Flugexperiments zeigte in der Anfangsphase deutliche Unterschiede bei den beiden Ciliatenspezies: *Paramecium* reagierte auf die verschiedenen Phasen des Fluges mit stärkeren Änderungen des cAMP-Levels als *Tetrahymena*. Ausgehend von dem jeweiligen durchschnittlichen Grundlevel der Einzeller bei 1g (11 pmol/mg Protein bei *Paramecium*; 1,2 pmol/mg Protein bei *Tetrahymena*) lag die Veränderung bei *Paramecium* zwischen -44% in der Phase der Beschleunigung und -40% im letzten Drittel der μg -Phase und bei *Tetrahymena* zwischen 36% Zuwachs beim Maximallevel kurz nach der Beschleunigungsphase und 20% Verlust gegenüber dem Mittelwert bei 1g im letzten Drittel der μg -Phase.

3.5.2.2. cGMP-Konzentrationen bei *Tetrahymena* und *Paramecium*

Auch cGMP spielt als Second-Messenger zur Regulation des Cilienschlags bei den untersuchten Einzellern eine wichtige Rolle. Unter den Versuchsbedingungen des TEXUS-Fluges zeigten sich bei *Tetrahymena* in den cGMP-Levels keine Unterschiede zur 1g-Kontrolle. Die Konzentrationen lagen sowohl während der Beschleunigungsphase, als auch in der gesamten μg -Phase innerhalb des Bereichs der Kontrolle zwischen 25,59 pmol/mg Protein und 11,09 pmol/mg Protein. Das cGMP-System reagierte folglich nicht auf die veränderten Beschleunigungsbedingungen. Dieser Befund zeigte sich auch bei *Paramecium*, bei dem die cGMP-Konzentrationen zwischen 64,64 pmol/mg Protein und 26,70 pmol/mg Protein lagen.

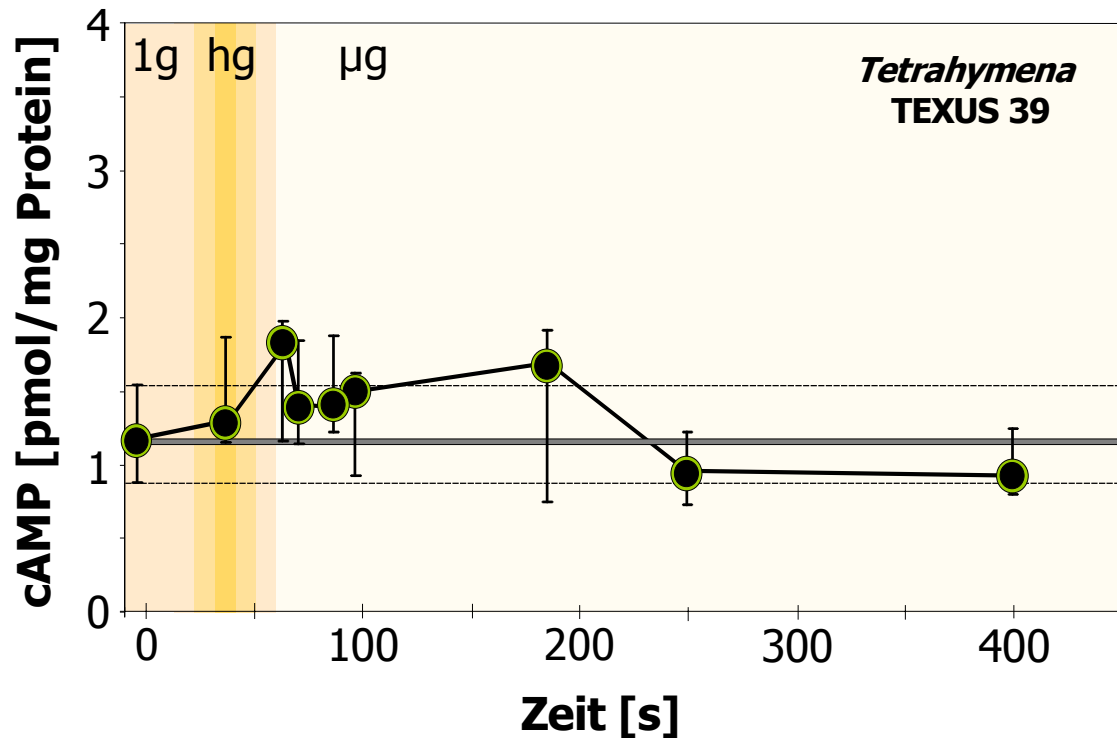


Abb. 29a: cAMP-Konzentration [pmol/mg Protein] bei *Tetrahymena* während des TEXUS 39-Fluges. Nach der Hypergravitationsphase ist ein kurzzeitiger Anstieg zu beobachten. Erst gegen Ende der Mikrogravitationsphase fällt die Konzentration unter den 1g-Wert ab. (hg=Hypergravitation; µg=Mikrogravitation)

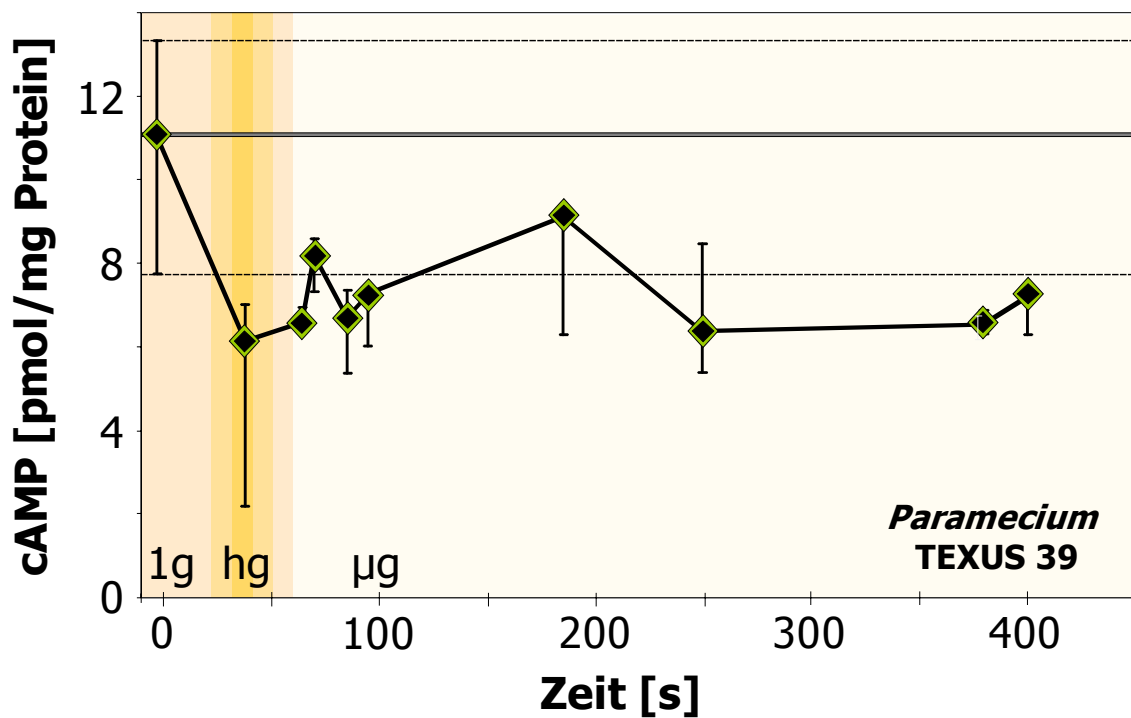


Abb. 29b: cAMP-Konzentration [pmol/mg Protein] während des TEXUS 39-Fluges bei *Paramecium* (modifiziert nach C. Stieber, 2001). In der Hypergravitationsphase fällt die Konzentration des sekundären Botenstoffs deutlich ab und steigt dann beim Übergang in die Mikrogravitationsphase zunächst wieder leicht an. Gegen Ende dieser Flugphase sinkt die Konzentration dann wieder ab. (hg=Hypergravitation; µg=Mikrogravitation)

4. Diskussion

Die vorliegenden Ergebnisse belegen, dass Langzeitkultivierung in niedriger Temperatur Verhalten, Morphologie und Physiologie der untersuchten Ciliaten beeinflusst. Nach heutigem Kenntnisstand wird angenommen, dass Gravikinese das Ergebnis einer aktiven Graviperzeption ist und dass Gravitaxis bzw. die Graviorientierung auf einem Zusammenspiel von physikalischen und physiologischen Mechanismen beruht. Im Folgenden werden die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit in Bezug auf zwei Modelle der Schwerkraftperzeption in Ciliaten und auf die ökologischen Konsequenzen für die Einzeller diskutiert. Stützen die Ergebnisse einen aktiven, physiologischen Mechanismus (Statocystenhypothese, s. 1.2.) oder einen passiven, physikalischen Mechanismus („Bojenprinzip“, s. 1.2.)?

4.1. Verhaltensänderungen durch Temperatureinfluss

Bei beiden untersuchten Ciliatenspezies (*Paramecium*, *Tetrahymena*) zeigte sich eine Abhängigkeit des gravisensitiven Verhaltens von der Kultivierungstemperatur. In der Langzeitkultivierung in niedriger Temperatur geht die aktive Raumorientierung (Gravitaxis) beider Protozoen verloren. Versuche mit immobilisierten Ciliaten zeigten, dass die Zellen sowohl in der Kälte als auch bei Raumtemperatur mit unterschiedlichsten Raumorientierungen sedimentieren (Freiberger, 1997). Im Gegensatz zur Gravitaxis bleibt die Gravikinese von *Paramecium* auch in der Langzeitkältekultur erhalten (Freiberger, 1997). Die Einzeller sind also weiterhin in der Lage die Schwerkraft wahrzunehmen. Eine Interpretation der unterschiedlichen „Reaktionen“ der beiden schwerkraftabhängigen Verhaltensweisen auf die Kälte ist zunächst schwierig.

4.1.1. Gravikinese unter Temperatureinfluss

Tetrahymena zeigte wie *Paramecium* (Freiberger, 1997) bei Kultivierung in 10°C keine Gravitaxis, wobei die Zufallsverteilung bei diesem Organismus bereits nach 7 Tagen zu beobachten ist, bei *Paramecium* erst nach über 14 Tagen. Bei beiden

Spezies nahmen die Schwimmgeschwindigkeiten bereits nach einem Tag in niedriger Temperatur ab, wobei die Abnahme bei *Paramecium* deutlich geringer war als bei *Tetrahymena*.

Während bei *Paramecium* die Gravikinese nicht nur erhalten blieb, sondern die Größenordnung der gravikinetischen Komponente auch während der gesamten Versuchsdauer (bis 99 Tage in 10°C, 106 Tage in 4°C) im „Schwankungsbereich“ der 20°C-Kontrolle lag (Freiberger, 1997), zeigte sich bei *Tetrahymena* eine deutliche Abnahme der Werte der gravikinetischen Komponente. *Tetrahymena* war zwar weiter in der Lage, die Sedimentation auszugleichen, zeigte jedoch keine Überkompensation mehr wie in 20°C. Diese Überkompensation unter Normalbedingungen wurde auch von Kowalewski (1997) beschrieben.

Sedimentationsexperimente zeigten bei beiden Spezies kälteunabhängige Sedimentationswerte und variable Lagen der immobilisierten Zellen im Raum. Variable Raumorientierungen sedimentierender Zellen bei 20°C wurden auch von Kuznicki (1968) beschrieben, während Nagel (1998) und Watzke (2000), die beide speziell *Paramecium caudatum* untersuchten, beobachteten, dass eine Mehrzahl immobilisierter Zellen mit dem posterioren Zellpol nach unten sedimentiert. Eine solche gerichtete Sedimentationslage der Einzeller ist bei einem rein physikalischen Effekt zu erwarten. Das beobachtete Verhalten im Rahmen meiner Sedimentationsuntersuchungen lässt sich aber nicht über ein Bojenprinzip („Mechanische Hypothese“) erklären, denn danach müssten sedimentierende Zellen bei 20°C eine senkrechte Längsausrichtung zeigen (Boje), die in 10°C (4°C) mit dem Verlust der Gravitaxis verloren geht.

Für beide Einzeller lässt sich damit feststellen, dass sie auch in der Kälte grundsätzlich ihre Fähigkeit behalten, auf Beschleunigungen zu reagieren. Die Abnahme der Schwimmgeschwindigkeiten bzw. die von den Einzellern in unterschiedlichen Kultivierungssituationen gezeigt Höhe der Geschwindigkeiten spielt bei der Ausprägung einer Gravikinese bei *Paramecium* keine Rolle und bestätigt damit die Befunde von Machemer und Machemer-Röhnisch (1996). Bei

Tetrahymena lässt sich diese Aussage aufgrund der Abnahme der Kompensationsfähigkeit nicht bestätigen. Es ist also davon auszugehen, dass ein aktiver physiologischer Mechanismus, über den sich die Gravikinese erklären lässt (Machemer et al., 1991), auch in der Kälte funktioniert. Ganz anders sieht das beim gravitaktischen Verhalten beider Ciliaten aus (Machemer & Bräucker, 1996). Kälte induziert in beiden Spezies einen Verlust der Gravitaxis, wenn auch mit unterschiedlichem Zeitverlauf. Dieser beschreibt dabei die Zeit, die vergeht bis eine Einzellerkultur unter den veränderten Kultivierungsbedingungen ein geändertes Verhalten zeigt.

Die Frage bleibt zunächst offen, ob diese Ergebnisse für grundsätzlich unterschiedliche Mechanismen der Signalverarbeitung bei den beiden Schwerkraftantworten sprechen, oder lediglich verschiedene Schritte in der Signalkette durchlaufen werden. Auch bei Zentrifugenexperimenten mit *Paramecium* wurde eine zeitliche Trennung von Gravitaxis und Gravikinese als Antwort auf den Beschleunigungsreiz beobachtet (Bräucker et al., 1994; Hemmersbach et al. 1996b, 2001).

4.1.2. Reversalrate unter Temperatureinfluss

Der Verlust der Gravitaxis in der niedriger Kultivierungstemperatur könnte auch über eine Änderung in der Reversalfrequenz induziert werden. Reversals sind vom physiologischen Zustand der Zellen abhängig und werden spontan durch interne wie auch externe Reize ausgelöst. Theoretisch kann eine Erhöhung der Reversalrate dazu führen, dass eine gravitaktische Antwort überdeckt wird, obwohl weiter eine Perzeption erfolgt. Eine niedrigere Reversalrate bei gleichzeitigem Aufheben der Gravitaxis spräche dagegen eher für den tatsächlichen Verlust der Reaktionsfähigkeit auf den Beschleunigungsreiz, da die Zellen sonst geradliniger und länger in die gleiche Richtung schwimmen und somit die Gravitaxis verstärkt sein müsste. Eine Abnahme der Reaktionsfähigkeit könnte auch eine Erklärung für eine schwächer ausgeprägte Gravikinese sein.

Die Versuche haben gezeigt, dass die Reversalrate im Vergleich zur 20°C-Kontrolle bei *Paramecium* sinkt, die Zellen also tatsächlich geradliniger schwimmen und ihre einmal eingeschlagene Richtung länger beibehalten. Eine Gravitaxis sollte also theoretisch noch verstärkt und der r-Wert als Gradmaß der Orientierung größer werden. Dass dies nicht der Fall ist und die Gravitaxis trotzdem verloren geht, spricht für eine Beeinflussung der Physiologie der Einzeller durch die niedrige Kultivierungstemperatur. Die Veränderungen könnten die Eigenschaften der Zellmembran und das Membranpotential betreffen. Veränderungen der Membranen könnten über den Eingangswiderstand, die Verteilung bzw. Öffnungsmöglichkeit bzw. -wahrscheinlichkeit der an der Perzeption beteiligten mechanosensitiven Kanäle zu der veränderten Reversalrate führen. Davon müsste auch die Gravikinese der Zellen betroffen sein. Zum Beispiel sollte eine Erhöhung des Eingangswiderstandes durch die Temperatur die Perzeptionsfähigkeit der Zellmembranen herabsetzen und zumindest zu einer Veränderung der Reaktionsfähigkeit führen. Martinac und Machemer (1984) haben jedoch für *Paramecium* keine temperaturabhängige Änderung des Membranpotentials (von 18°C nach 10°C bzw. 25°C) gefunden.

Betrachtet man die Reversalrate von *Tetrahymena* zeigt sich zunächst der umgekehrte Effekt, da die kurzfristig stark ansteigt. Erst in der Langzeitkältekultur fällt die Rate wieder ab und nähert sich dem 20°C-Wert. Die Orientierung der Zellen nimmt zeitgleich deutlich ab. Dann aber steigt der r-Wert in der Langzeitkultur wieder leicht an, es bleibt jedoch insgesamt bei einer Zufallsverteilung der Schwimmrichtung. Für die frühe Phase des Temperatureinflusses lässt sich daher eine Kopplung der Effekte (erhöhte Reversalrate und schlechtere Orientierung) diskutieren, während in der Langzeitkultur auch andere Effekte für den Verlust der Gravitaxis eine größere Rolle spielen könnten. Vermehrte spontane Depolarisationen und damit erhöhte Reversalhäufigkeit der Zellen sprechen wiederum für Veränderungen in der Kanalaktivität bzw. Einflüsse auf den Eingangswiderstand bei *Tetrahymena*, die sich vor allem in der frühen Phase in niedriger Temperatur auswirken, wenn die Gravitaxis noch vorhanden ist. Dieser Befund stützt bei *Tetrahymena* die Annahme

einer mechanischen Ausrichtung des Einzellers, die nicht durch eine erhöhte Reversalrate überdeckt wird.

Connolly und Co-Autoren haben für *Tetrahymena* Veränderungen des Membranpotentials bei Erniedrigung der Kultivierungstemperatur (von 38°C bzw. 20°C nach 10°C) gefunden (Connolly et al., 1985a, 1985b). Sie unterscheiden aufgrund ihrer Kultivierungs- und Untersuchungsmethode Kurzzeit- und Langzeit-Effekte. Die Kurzzeit-Effekte treten vor allem direkt beim Abkühlen der Zellen auf, wobei es zu einem deutlichen Absinken des Membranpotentials kommt. In den Langzeit-Effekten spiegelt sich dagegen eine Anpassung der Zellen an ihre Kultivierungstemperatur wider. Das Membranpotential stabilisiert sich. Die Autoren diskutieren anfängliche Membranveränderungen durch die Temperatur, in der Langzeitkältekultur könnten dann stabilisierende Effekte durch Membranproteine in den Vordergrund treten.

Die in meinen Ergebnissen beobachtete Stabilisierung der Reversalraten bei *Tetrahymena* in der Langzeitkältekultur deutet in die gleiche Richtung wie die Untersuchungen von Connolly et al. (1985a, 1985b). Die frühe Phase, in der Connolly und Co-Autoren eine Veränderung des Membranpotentials gefunden haben, lässt jedoch keine Rückschlüsse auf meine eigenen Ergebnisse zu, da die Zellen zum Zeitpunkt der Messung, anders als bei Connolly, bereits an die niedriger Temperaturen adaptiert waren.

4.2. Zellmorphologie als Ursache von Verhaltensänderungen

Elektronen- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten morphologische Veränderungen in Bezug auf Speicherlipideinlagerungen in den Ciliaten. Bei *Paramecium* und *Tetrahymena* waren deutliche Unterschiede bei der Verteilung der Lipidtropfen im Cytoplasma zu finden. Diese waren artspezifisch, temperatur- und zeitabhängig.

Aus Untersuchungen von Ramoino et al. (1996, 1999) war bereits bekannt, dass sich in *Paramecium*-Zellen in 20°C, in der stationären Wachstumsphase der Kultur, ein distinktes Verteilungsmuster kleiner Lipidtropfen an beiden Polen der Zelle beobachten lässt. Meine Beobachtungen zeigen nun, dass sich dieses Muster im Laufe der Kultivierung in den niedrigen Temperaturen veränderte: die Tropfen wurden deutlich kleiner und waren über das gesamte Cytoplasma verteilt. Bei der Langzeithälterung in der Kälte verschwanden die Speicherlipidtropfen schließlich fast vollständig. Mit dem Verschwinden der Lipidtropfen könnte eine Veränderung des Bojeneffekts auftreten, wenn die Drehmomente, die die Zelle aufrichten, von der Lage und Menge der Tropfen bestimmt oder beeinflusst werden. Ob andererseits ein lipidärmeres Cytoplasma an „Schwere“ gewinnt und damit die physiologische Perzeption durch Druckwirkung auf die mechanosensitiven Ionenkanäle verändert wird und damit Verbesserung der Graviperzeption eintritt, ist fraglich.

Bei *Tetrahymena* zeigt sich bezüglich der Speicherlipideinlagerungen eine andere Verteilung als bei *Paramecium*. Bei diesem sehr viel kleineren Einzeller (*Tetrahymena pyriformis*: Länge: 60 µm / *Paramecium biaurelia*: 150 µm) gab es in 20°C weitaus mehr Lipidtropfen als bei *Paramecium* und diese waren in einem zufälligen Muster im Cytoplasma verteilt. Das änderte sich jedoch sehr schnell bei der Kultivierung in 10°C. Die Tropfen wurden größer und zahlreicher. Betrachtet man das physiologische Modell für diesen Fall, so ergibt sich die folgende Überlegung: wird das Cytoplasma „leichter“ übt es weniger Druck auf die Membran bzw. die mechanosensitiven Ionenkanäle aus. Es sollte zu einer „schwächeren“ Perzeption kommen und damit zu einer abgeschwächten Reaktion. Bei Dichtemessungen (s.u.) zeigten bei *Tetrahymena* jedoch keine durch die Lipideinlagerungen induzierten Änderungen. Damit sollte *Tetrahymena* weiter in der Lage sein, die Schwerkraft über einen physiologischen Mechanismus zu perzipieren. Das erklärt den Erhalt der Gravikinese, gibt jedoch keinen Hinweis auf die Signalkette der Gravitaxis.

Für die beobachteten Veränderungen der Lipidspeicherung kann es verschiedene Erklärungen geben. Eine Veränderung der Speicherlipide könnte eine Anpassung an die kälteren Temperaturen und an schlechtere Lebensbedingungen sein. Da *Paramecium biaurelia* und auch *Tetrahymena pyriformis* in den kälteren Jahreszeiten keine Cysten bilden, könnte die Veränderung des Lipidgehaltes Schutz- und Speicherfunktion haben. Einlagerungen verschiedener niedermolekularer Stoffe, wie beispielsweise auch Glycoside, werden von verschiedenen Organismen, besonders in klimatisch „unwirtlichen“ Zonen, als Kälteschutz angelegt (Spindler et al., 1991).

Neben einem Frostschutz können Speicherlipide auch einen Weg zu schnelleren Membrananpassungen an extreme Bedingungen bieten. In diesem Zusammenhang muss die Reaktionsfähigkeit der Membranen in Bezug auf Kanalverteilung bzw. –aktivität gesehen werden. Die Fluidität der Membranen ist eine lebenswichtige Funktion, die unter allen möglichen Umweltbedingungen funktionieren muss, da frei lebende Zellen über ihre Membran in ständigem Austausch mit ihrer Umwelt stehen. Membranstrukturen können von der Temperatur beeinflusst werden (s.u.). Um die Fluidität und Elastizität der Membran und damit ihre Funktionsfähigkeit aufrecht zu erhalten, sind gerade bei längerfristigen Kälteexpositionen Umbauten nötig. Die Reaktionen treten teilweise sehr schnell auf. Für erhöhte Temperaturen ist bekannt, dass mehr gesättigte Fettsäuren in die Membran eingebaut werden, um diese zu stabilisieren (Nozawa & Thompson, 1979). Mehr ungesättigte Fettsäuren dagegen sorgen dafür, dass die Membranen in Kälte nicht „gefrieren“. Damit wird auch die Funktion von Ionenkanälen und anderen Transportmechanismen in den Membranen gewährleistet.

Da Ciliaten in der Lage sind, ihre Membranen schnell und effektiv an veränderte Temperaturbedingungen anzupassen (Nozawa & Thompson, 1979; Sakamoto et al., 1997) und so eine ausreichende Fluidität aufrecht erhalten, sollten folglich auch über die Membran gesteuerte Verhaltensreaktionen in der Kälte erhalten bleiben, was durch die Befunde zur Gravikinese gestützt wird. Dass *Paramecium*

und *Tetrahymena* so unterschiedliche Strategien in der Lipideinlagerung zeigen, macht sie für verschiedenste Fragestellungen sehr interessant.

Die Dichte der Zellen wurde als physikalischer „Parameter“ aufgrund der Ergebnisse der Elektronen- und Fluoreszenzmikroskopie untersucht, da das physiologische Modell der Reizperzeption (s. 1.2.) davon ausgeht, dass der vom Cytoplasma ausgeübte Druck auf die Membranen aufgrund des Dichteunterschiedes zwischen Zelle und Medium eine entscheidende Rolle bei der Wahrnehmung des Beschleunigungsreizes spielt (s. 1.2.).

Die Dichte der beiden untersuchten Ciliaten ist unter Normalbedingungen (20°C) etwa 4% höher als die Dichte des umgebenden Mediums (Kanda, 1914; Roberts, 1970; Kuroda et al. 1986; Taneda et al. 1987; Hemmersbach et al., 1997b; Kowalewski, 1997). Durch diesen Dichteunterschied werden die Zellen theoretisch in die Lage versetzt, Beschleunigungskräfte über eine Belastung ihrer jeweils unten liegenden Zellmembran und eine damit gekoppelte Öffnung von mechanosensitiven Ionenkanälen zu perzipieren. Bei Verringerung der Dichte des Zellplasmas sollte der Druck auf die Membran abnehmen und die Wahrnehmung der Beschleunigung könnte über diesen Weg nicht mehr oder nur noch in geringerem Maße stattfinden: das gravisensitive Verhalten der Einzeller wäre aufgehoben. Dieser Effekt wurde schon bei Versuchen in dichteangepasstem Medium beobachtet (Schmidt, 1997; Hemmersbach et al., 2001). In einem Medium, dessen Dichte der Zelldichte entspricht, zeigten die Einzeller keine Reaktionen mehr auf die Schwerkraft. Dieses Ergebnis erlaubt keine Unterscheidung zwischen einem physiologischen und einem physikalischen Mechanismus, da die Sedimentation der Zellen in einem dichteangepassten Medium ebenfalls beeinflusst wird. Es zeigt aber, dass ein potentieller Gravirezeptor entweder auf Membranebene, d.h. nicht intrazellulär lokalisiert ist oder dass das Verhalten über einen physikalischen Mechanismus gesteuert wird, der die mechanischen Eigenschaften und die Form der Zellen zur Ausrichtung nutzt. Im Falle eines intrazellulären Gravirezeptors haben Dichteveränderungen zwischen Zelle und Medium keinen Einfluss auf dessen Funktion, wie z.B. im Falle

des Statocystenorganells (Müllersches Organell) von *Loxodes* gezeigt wurde (Hemmersbach, 1997b; Hemmersbach et al., 2001).

Wie die Messungen in niedriger Temperatur gezeigt haben, war die Zelldichte gegenüber den Kontrollen (20°C) unverändert. Die physiologischen Voraussetzungen für eine Reizperzeption sollten also weiterhin vorhanden sein, was durch die unveränderte gravikinetische Reaktion der *Paramecien* gestützt wird und eine Erklärung für das Vorhandensein, aber nicht für die Reduktion der Gravikinese von *Tetrahymena* liefert. Die unveränderte Dichte in Kälte liefert ebenfalls keine Erklärung für das Verschwinden der Gravitaxis bei beiden Einzellern. Davon ausgehend, dass in der Dichteverteilung innerhalb der Zelle keine Verschiebungen stattgefunden haben, sollten die Drehmomente der Zelle weiter erhalten sein, so dass eine mechanische Aufrichtung der Ciliaten möglich wäre.

Weitere morphologische Strukturen der Einzeller, die auch an der Perzeption von Beschleunigungen beteiligt und von niedrigen Temperaturen beeinflusst sein könnten, wie das Cytoskelett, sind bisher nur ansatzweise untersucht. So ist bekannt, dass cytoplasmatische Mikrotubuli in Kälte ungeordneter strukturiert sind (Cohen & Beisson, 1988). Die Struktur der Cilien (stabile Mikrotubuli) ist, wie die vorliegenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen zeigen, in der Kälte nicht verändert. Das stimmt mit der Beobachtung überein, dass die Einzeller auch in den niedrigen Temperaturen weiterhin schwimmen und reagieren. Für die Beurteilung der cytoplasmatischen Mikrotubuli in Ciliaten sind die zweidimensionalen elektronenmikroskopischen Schnitte nicht aussagekräftig, da immer nur kleine Ausschnitte erfasst sind.

Veränderungen von Cytoskelettstrukturen könnten jedoch die Form der Zellen beeinflussen und damit die „Bojeneigenschaften“ der Ciliaten verändern, wenn die Zellform sich durch einen Verlust der Formstabilität stark abrundet. Weiterhin wäre es auch möglich, dass Auswirkungen auf die Graviperzeption über die Ionenkanäle auftreten, da stabilisierende unterhalb der Membran liegende Mikrotubuli nicht nur die Zellform beeinflussen, sondern wahrscheinlich auch an

der Verstärkung der Schwerkraftsignale beteiligt sind (Machemer-Röhnisch et al., 1996).

Je „runder“ eine Zelle ist, desto schlechter funktioniert sie als Boje und kann sich daher schlechter ausrichten, wenn die Masse innerhalb der Zelle relativ gleichmäßig verteilt ist. Unter der Annahme, dass die Gravitaxis vorrangig durch die physikalisch bedingte Ausrichtung der Zellen vermittelt wird, könnte sich aus der Veränderung der Zellform eine Erklärung für den Verlust der Gravitaxis ergeben, wenn die Formänderungen drastisch genug wären. Dies gilt nicht nur für *Paramecium* mit seiner sehr ausgeprägt polarisierten, elipsoiden Form, sondern auch für *Tetrahymena* mit seiner Tropfenform. Ein evtl. als Verstärkung dienender physiologischer Anteil an der Gravitaxis würde dabei in den Hintergrund treten und wäre alleine wahrscheinlich nicht stark genug, um die Gravitaxis aufrecht zu erhalten. Eine Verschlankung der Zellen könnte aber auch direkt dazu führen, dass der physiologische Anteil der Graviperzeption schwächer wird, indem sich weniger „Andruckfläche“ für das Cytoplasma bietet und so weniger Ionenkanäle angesprochen werden.

Bei beiden Ciliaten wurde in der Kälte eine deutliche Tendenz zur Abrundung beobachtet. Bei *Tetrahymena* ist diese Tendenz wesentlich stärker ausgeprägt als bei *Paramecium*. Zudem wird *Tetrahymena* in der Kältekultur größer. Bei *Paramecium* kehrt sich dagegen die anfängliche Vergrößerung der Zellfläche bei längerer Kultivierung in niedriger Temperatur ins Gegenteil um – die Zellen schrumpfen. Die Abrundung der *Paramecium*-Zellen ist auch nicht so ausgeprägt, dass die längliche Form gänzlich verloren geht. Bei *Tetrahymena*, der sehr viel kleineren Zelle, verschwindet die Gravitaxis parallel zur schnellen Vergrößerung der Zellfläche schon nach kurzer Zeit, geht also nicht mit der Abrundung der Zellen, die erst in der Langzeitkultur deutlich ausgeprägt ist, einher.

Betrachtet man die Formveränderungen in Bezug auf das Verhalten von *Tetrahymena*, kommt man zu dem Schluss, dass eine physikalische Ausrichtung nach dem Bojenprinzip in der Kälte zunächst noch funktionieren sollte, was auch

zu beobachten ist. In der Langzeitkultur kann dagegen die starke Abrundung der Zellen eine Erklärung für den Verlust der Gravitaxis sein. Die Vergrößerung der Zellen scheint dagegen keinen direkten Einfluss auszuüben, d.h. die Größe der Andruckfläche scheint kein Effekt auf eine physiologische Perzeption zu haben. Theoretisch könnte das daran liegen, dass zwar die Fläche vergrößert ist, aber nicht mehr Kanäle zur Verfügung stehen. Wenn sich die gleiche Anzahl Kanäle auf einer größeren Fläche verteilt, kann sogar der gegenteilige Effekt auftreten und die Perzeptionsstärke abgeschwächt werden. Darin könnte eine Erklärung für die schwächere Gravikinese bei *Tetrahymena* zu finden sein. Das ist jedoch allein aus den vorliegenden Untersuchungen nicht abschließend zu beurteilen.

Die Analyse der Kanalanzahl pro Zellfläche im Vergleich zwischen den verschiedenen Versuchstemperaturen bzw. vergleichende Messungen des Membranwiderstandes in den beiden Temperaturen (20°C / 10°C) und einer daraus folgenden Abschätzung der Kanalzahl könnte ein weiterer Schritt zur Klärung dieser Frage sein. Dies kann allerdings nur eine sehr vorsichtige Annäherung sein, da noch nicht zu bestimmen ist, welche und wie viele der mechanosensitiven Kanäle Gravirezeptorkanäle sind. Die Existenz von Gravirezeptorpotentialen wurde bei *Paramecium* von Gebauer et al. (1999) und bei *Stylonychia* von Krause (2003) nachgewiesen. Dabei konnten die vom physiologischen Modell (s. 1.2.) vorhergesagten Änderungen im Membranpotential (De- oder Hyperpolarisation) in Abhängigkeit von der Orientierung der Zelle zum Schwerkraftvektor gemessen werden.

Bei *Paramecium* lässt sich diese Frage ebenfalls nicht eindeutig beantworten. Während der Vergrößerung der Zelle in 10°C ist die Änderung der Zellform nicht sehr ausgeprägt. Zu diesem Zeitpunkt bleibt auch die Gravitaxis noch erhalten, d.h. die Vergrößerung scheint keine direkten Auswirkungen zu haben. In der Langzeitkultur in 10°C ändert sich die Zellform dann deutlicher; die Zellen werden schlanker und kleiner. Damit geht der Verlust der Gravitaxis einher. Da aber die Zellen ihre Bojenform nicht ganz verlieren, bleibt der Einfluss der Verschlankung auf das Verhalten jedoch fraglich. Eine Erklärung könnte auch hier die

Größenänderung liefern. Im Zusammenspiel mit der Verschlankung stellt sich die Zelle vielleicht ebenfalls nicht mehr als „Boje“ dar, wenn die innere Massenverteilung gleich bleibt, was nach den oben beschriebenen Ergebnissen zu elektronen- und fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen zu vermuten ist. Auf die Gravikinese von *Paramecium* haben Größen- und Formänderung aber offensichtlich keinen Einfluss.

Die vorliegenden Ergebnisse geben deutliche Hinweise darauf, dass die Gravitaxis bei beiden Einzellern physiologisch gesteuert wird, physikalischen Faktoren aber bei der Verstärkung, Steuerung etc. eine wichtige Rolle spielen. Für die Gravikinese bestätigen die Ergebnisse das Modell einer physiologischen Perzeption und Transduktion. Wie aber erfolgt die Steuerung und das Zusammenspiel von Gravitaxis und Gravikinese? Diese Frage lässt sich auch mit den vorliegenden Ergebnissen nicht eindeutig beantworten.

4.3. Indolaminkonzentration als Indikator für temperaturabhängige Anpassungen des Stoffwechsels

Melatonin und einige seiner Derivate, wie 5-Methoxy-Tryptamin, sind dafür bekannt, dass sie empfindlich auf Temperaturunterschiede bzw. -veränderungen reagieren und so z.B. auch als Zeitgeber funktionieren (Balzer & Hardeland, 1991a, b; Hardeland et al., 1993; Balzer & Hardeland, 1996; Kippert, 1996, 1997; Hasegawa et al., 1997). Für Einzeller sind diese Substanzen nicht nur als Signal- und Taktgeber für unterschiedliche physiologische Prozesse, sondern auch als Schutzsubstanzen wichtig.

Im Zusammenhang mit den niedrigen Temperaturen interessierte in der vorliegenden Arbeit vor allem die Dokumentation der Auswirkungen der niedrigen Temperatur auf kälteempfindliche physiologische Prozesse. Melatonin und 5-Methoxy-Tryptamin wurden dabei als Indikatoren für Stoffwechselveränderungen unter Temperatureinfluss genutzt. Zeigten sich Änderungen in den Konzentrationen dieser Substanzen durch permanenten „Kältestress“ in Einzellern, die ihr Wachstumsoptimum bei ca. 20°C haben?

4.3.1. Melatonin und 5`Methoxy-Tryptamin

Bei *Paramecium* zeigt sich in 20°C ein tageszeitabhängiges Maximum in der Melatoninkonzentration. Unter den niedrig temperierten Kulturbedingungen produzierte dieser Einzeller dann kein Melatonin mehr. Bei *Tetrahymena* sinkt die Melatoninproduktion deutlich ab. Es wird also insgesamt in der Kälte sehr viel weniger oder sogar gar kein Melatonin mehr produziert. Ob dies einer Art „Kälteschlaf“ bestimmter physiologischer Prozesse entspricht, wie man das vielleicht bei cystenbildenden Organismen erwarten würde, kann man anhand dieser Einzeldaten nicht feststellen.

Die 5`Methoxy-Tryptamin-Konzentration (5`MT) zeigte ebenfalls bei beiden Organismen einen Tagesverlauf. Bei *Paramecium* traten in 20°C Schwankungen der 5`MT-Menge innerhalb eines 24stündigen Verlaufs auf. Der Tagesrhythmus blieb auch in der niedrigen Temperatur trotz geringerer Konzentration an 5`MT erhalten. Die Berechnung der Abnahme der Konzentration an den einzelnen Messpunkten zeigte, dass sich nicht eindeutig klären lässt, ob die Anpassung an die Kälte durch eine Veränderung der Enzymtätigkeit (passiv, 50%/10°C) oder durch die zur Verfügung stehende Enzymmenge erreicht wird. Die Konzentrationsabnahme liegt mit Werten zwischen 40% und 60% in einer Größenordnung, in der beide Mechanismen eine Erklärung bieten könnten.

Tetrahymena besitzt in 20°C ebenfalls einen circadianen Rhythmus der 5`MT-Konzentration. In 10°C sinkt die Konzentration stark ab und der regelmäßige Verlauf verschwindet völlig. Die Stärke der Abnahme um 70-90% im Maximum der Kurve der Langzeitkultur weist auf eine aktive Regulierung über die Enzymmenge hin. Eine Regulierung über die reine Auslastung der bereits vorhandenen Enzymmenge kann bei dieser starken Abnahme nicht mehr funktionieren. Das Absinken der 5`MT-Konzentration lässt sich nicht allein mit der Auslastung der vorhandenen Enzymmenge erklären, wenn man vom Einfluss der niedrigen Temperatur auf die Enzymtätigkeit ausgeht.

In der reduzierten Produktion von Melatonin bei *Tetrahymena* und der fehlenden Produktion bei *Paramecium*, sowie der Reduktion von 5`MT in beiden Organismen zeigt sich sehr deutlich, dass die niedrigen Kulturtemperaturen einen starken Einfluss auf den Stoffwechsel der Einzeller ausüben. Damit bestätigt sich der Eindruck, dass physiologische und biochemische Prozesse, zu denen auch die Enzymtätigkeiten und Signalverarbeitung zählen, unter „Kältestress“ herabgesetzt sein können, wie sich in der oben beschriebenen Enzymkinetik zeigt (Betrachtung nach Michaelis-Menten), und sich damit auch direkt auf das Verhalten der Einzeller auswirken.

Gleichzeitig weist der Erhalt des Tagesrhythmus der 5`MT-Produktion bei *Paramecium* in 10°C darauf hin, dass eine geringere Menge nicht unbedingt mit einem vollständigen Funktionsverlust einher gehen muss. Es stellt sich die Frage, welche Konzentration eines biochemischen Signalstoffes unbedingt notwendig ist, um eine physiologische Reaktion aufrecht zu erhalten.

4.4. Auswirkungen von Beschleunigungen auf die Second Messenger-Konzentrationen von *Tetrahymena*

Im physiologischen Modell der Graviperzeption und –transduktion wird die Rolle der Second Messenger cAMP und cGMP diskutiert. In Hypergravitation verstärken sich die negative Gravitaxis und die Gravitaxine, in Mikrogravitation gehen beide Antworten verloren (Bräucker et al., 1994; Hemmersbach et al., 1996b). Nach den Annahmen des Statocystenmodells sollte z.B. eine Erhöhung der Schwerkraft (Beschleunigung) den Druck des Cytoplasmas auf die posteriore Membran in einer gravitaktischen Zelle verstärken und somit eine vermehrte Öffnung mechanosensitiver Ionenkanäle bewirken. Da cAMP der Second Messenger bei hyperpolarisierenden Reizen ist (Hennessey et al., 1985; Bonini et al., 1986; Schultz et al., 1992), sollte dann die cAMP-Konzentration in negativ gravitaktischen Zellen ansteigen. Für die Situation in Mikrogravitation wird das Umgekehrte postuliert: Wegfall des Drucks auf die Membran – Abnahme der cAMP-Konzentration – Aufheben des gravisensitiven Verhaltens (Modell s. 1.2.). Im Gegensatz dazu sollte das cGMP-System bei aufwärts schwimmenden

Einzellern durch eine Änderung des Beschleunigungsreizes nicht beeinflusst werden, da cGMP mit Depolarisationsvorgängen und folglich mechanischen Reizungen an der anterioren Membran in Verbindung gebracht wird (Schultz & Klumpp, 1984).

Im Rahmen meines Promotionsvorhabens sollte untersucht werden, ob Änderungen des Beschleunigungsreizes (Hyper- (hg) und Mikrogravitation (μg)) den Gehalt an sekundären Botenstoffen beeinflussen.

4.4.1. Hypergravitation

Wie sich in den Arbeiten von Ch. Stieber (Stieber, 2001) zeigte, reagierte *Paramecium* unter kurzzeitiger Hypergravitation (hg) auf der Zentrifuge (45 s, 9g; entspricht der Raketenstartbeschleunigung) wie nach dem Modell erwartet. Es kam zu einem sofortigen Anstieg der cAMP-Konzentration, der auch nach dem Stoppen der Zentrifuge zunächst noch bestehen blieb. Da in der Vorbereitung der Versuche jede sonstige mechanische Reizung ausgeschlossen wurde, ist davon auszugehen, dass die erhöhte Konzentration allein auf den verstärkten Reiz der Beschleunigung zurückzuführen war. Die Störung durch das Einspritzen des Fixativs kann vernachlässigt werden, da es zu einer schnellen Durchmischung und Fixierung kam. Nach Ausschalten der Zentrifuge sich der cAMP-Level wieder auf den Ausgangswert ein.

Tetrahymena zeigte bei der kurzzeitigen Exposition in 9g (45 s) ein anderes Verhalten. Dieser Ciliat benötigte offensichtlich für die Wahrnehmung der Beschleunigung und/oder die Reaktion einen längeren Zeitraum; es kam zu einer Reaktionsverzögerung. Der Anstieg der cAMP-Konzentration erfolgte hier erst nach dem Stoppen der Zentrifuge, nach 60 s. Während der Zentrifugation (45 s) fiel der Wert unter den Kontrollwert ab (Stieber, 2001). Verzögerte Reaktionen auf Beschleunigungsreize dieses Ciliaten gegenüber anderen Spezies konnten auch schon von Anderen (Kowalewski, pers. Mitteilung) beobachtet werden.

In der vorliegenden Arbeit wurde nun die Reaktion von *Tetrahymena* auf eine längere Exposition in Hypergravitation untersucht. Bei 3g zeigte sich während der 10 min andauernden Zentrifugation keine Erhöhung des cAMP-Levels gegenüber dem Ausgangsniveau. Bei 5g war bereits nach 1 min eine mittlere Erhöhung auf über 250% des Ausgangsniveaus festzustellen, bis 5 min ein weiterer Anstieg (>450%) und nach 10 min wieder ein Abfall auf das 1g-Niveau, obwohl der Reiz weiter vorhanden war. Beim 9g-Reiz zeigte sich keine cAMP-Änderung durch die Zentrifugation.

Bleibt der Beschleunigungsreiz länger bestehen, ist bei *Tetrahymena* eine mögliche Reaktion auf den cAMP-Level aufgrund der hohen Schwankungen der Werte nicht zu belegen. Bei Hypergravitation besteht zudem die Frage, wie lange die Zellen Energie aufwenden und gegen die erhöhte Schwerkraft anschwimmen können. Früher durchgeführte Verhaltensuntersuchungen (Schmand, pers. Mitteilung) zeigten, dass *Tetrahymena* nicht mehr in der Lage sind, gegen 9g anzuschwimmen.

Das Versuchsprofil der kurzzeitigen Exposition bei 9g diene als Vorbereitung für das im Folgenden diskutierte Mikrogravitations-Experiment. Dabei muss man die verzögerte Erhöhung des cAMP-Levels bei *Tetrahymena* nach 1 min 9g in die Interpretation der Ergebnisse einbeziehen. Die Reaktion auf die Schwerelosigkeit könnte auf cAMP-Ebene theoretisch verschoben sein bzw. die Reaktion auf Mikrogravitation dieses Einzellers überdecken.

4.4.2. Mikrogravitation

Im TEXUS 39-Experiment wurde die biochemische Reaktion der beiden Ciliaten-species (*Paramecium* und *Tetrahymena*) auf den Wegfall des Schwerkraftreizes untersucht, indem die cAMP- und die cGMP-Konzentrationen zu bestimmten Zeiten gemessen wurden.

Nach unserer Arbeitshypothese sollte der cAMP-Spiegel beim Ausschalten des Schwerkraftreizes absinken. Die Ergebnisse für *Paramecium* (Stieber, 2001)

bestätigen diese Hypothese. Nachdem die Effekte der Anfangsbeschleunigung, wie aufgrund der Vorversuche erwartet, nach >185 s abgeklungen sind, sinkt die cAMP-Konzentration. Das stimmt auch mit der Relaxation der Verhaltensänderungen überein, die in früheren TEXUS-Experimenten festgestellt wurden. Die Gravitaxis der Zellen verschwindet ca. 80 s nach Beginn in die μ g-Phase, während die Gravikinese noch eine Weile erhalten bleibt (ca. 2-3 min bis zur Relaxation) (Hemmersbach-Krause et al., 1993a, b; Bräucker et al., 1998). Zu den späteren Fixierungszeitpunkten während des Raketenexperiments sollten demnach Zellen erfasst werden, die sich im reizfreien Zustand befinden.

Tetrahymena zeigte im Gegensatz zu *Paramecium* eine andere Reaktion. Nach der Anfangsbeschleunigung war die cAMP-Konzentration leicht, aber nicht signifikant gegenüber dem 20°C-Basiswert, erhöht. Dieser Wert lag innerhalb des Konfidenzbereichs des Basiswertes und bis zum Ende des Experimentes war keine Veränderung des cAMP-Levels, wie es nach den Vorhersagen des Modells zu erwarten gewesen wäre, festzustellen. Es bleibt offen, ob sich die Tendenz zum Absinken des cAMP-Spiegel bei *Tetrahymena* durch eine längere Versuchszeit in μ g fortsetzen würde.

Da die Beschleunigungsphase der Rakete zunächst durch eine Linearbeschleunigung, und daran anschließend eine Zentrifugalbeschleunigung bestimmt wird (s. 2.3.2.), sind die genauen Auswirkungen auf die Zellen in den Versuchsspritzen schwer abzuschätzen (s. 2.3.2.). Die zunächst beobachtete kurzfristige Erhöhung der Konzentration von cAMP am Anfang der μ g-Phase bei *Tetrahymena* könnte eine nachlaufende Reaktion auf die Startbeschleunigung darstellen. Das Abklingen der Reaktion könnte mit zwei Phänomenen in Zusammenhang stehen: zum Einen mit dem Abbau bzw. der Abbaugeschwindigkeit des Second Messengers und zum Anderen mit Verstärker-Systemen innerhalb der Signaltransduktionskette. Geht man von einer Beteiligung des Cytoskeletts als Reizvermittler und Reizverstärker aus, ist es möglich, dass die Relaxation dieses Systems evtl. länger dauert, das Cytoskelett steht noch eine Weile unter Spannung. Damit ließe sich ein „Nachlauf“ des cAMP-Systems in der

µg-Phase erklären. Da die Reaktion jedoch nicht eindeutig ist, ist nur eine hypothetische Interpretation möglich.

Dass bei *Tetrahymena* unter Mikrogravitationsbedingungen keine Reaktion in Bezug auf die cAMP-Konzentration nachzuweisen ist, ist zunächst überraschend. Die Energie, die bei der vorliegenden Restbeschleunigung in Mikrogravitation auf die Ionenkanäle wirkt, ist vermutlich kleiner als die Wirkung der Brown'schen Molekularbewegung ($1,09 \times 10^{-22}$ gegenüber 2×10^{-21}), so dass sie nicht mehr ausreichen dürfte, um die Kanäle zu öffnen. Die Zellen sind so nicht mehr in der Lage, die Restbeschleunigung ($10^{-4}g$) wahrzunehmen. Das sollte für *Tetrahymena* und auch für *Paramecium* der Fall sein. Da *Tetrahymena* jedoch um einiges kleiner ist als *Paramecium*, ist auch denkbar, dass die „gating“-Energien bei diesem Einzeller größer sind und *Tetrahymena* damit unempfindlicher reagiert als *Paramecium*.

cGMP wird nach dem Modell der Schwerkraftperzeption mit abwärts schwimmenden Zellen in Verbindung gebracht (Depolarisation der Zellmembran). Unter dem Einfluss der Hypergravitationsphase während des Fluges war die abwärts gerichtete aktive Ausrichtung der Zellen nicht zu erwarten und konnte auch bei entsprechenden Zentrifugen-Experimenten nicht beobachtet werden. Folglich kann auch keine Änderung im cGMP-Level nach Eintritt in Mikrogravitation erwartet werden, d.h. das cGMP-System reagiert in beiden negativ gravitaktischen Einzellern nicht auf die Aufhebung der Schwerkraft.

Die verschiedenen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, im Hinblick auf ihre Relevanz für die Ciliaten in ihrem Lebensraum, dass das Verhalten letztendlich durch das Zusammenspiel verschiedener Umweltreize bestimmt wird. Neben der Nutzung der physikalischen Gegebenheiten der Zelle, ist Verhalten somit letztlich das Resultat der Verrechnung aller Rezeptorpotentiale auf der Ebene des Membranpotentials.

5. Zusammenfassung

Mittels unterschiedlicher Untersuchungsansätze wurde analysiert, wie verschiedene Umweltreize (Kälte und Beschleunigung) das Verhalten, die Physiologie und die physikalischen Eigenschaften von Einzellern beeinflussen. Die Einzeller (*Paramecium biaurelia* und *Tetrahymena pyriformis*) wurden als Modellsysteme gewählt, da sie distinkte Schwerkraftreaktionen zeigen, Hypothesen zum Zustandekommen dieser Reaktionen existieren und zu prüfen galten, und der Größenunterschied (*Paramecium*: 200 – 250 µm; *Tetrahymena*: 60 – 80 µm) Erkenntnisse bzgl. energetischer Gesichtspunkte liefert. Die Gravireaktion der Ciliaten besteht einerseits aus einer ausrichtenden Komponente (Gravitaxis) für deren Zustandekommen physikalische und/oder physiologische Mechanismen diskutiert werden, andererseits aus einer geschwindigkeitsmodulierenden, physiologischen Komponente (Gravikinese). Nach dem physikalischen Modell wird die Lage der Zelle unter anderem durch die Zellform bestimmt (Bojenprinzip), während nach dem physiologischen Modell der Schwerkraftwahrnehmung (Statocystenhypothese), abhängig von der Orientierung der Zelle im Schwerfeld, der Druck des Cytoplasmas auf die jeweils unten liegende Membran, de- oder hyperpolarisierende Änderungen des Membranpotentials induziert und somit den Cilienschlag reguliert.

Herabsetzen der Kultivierungstemperatur von 20°C auf 10° (4°) verändert das Schwimmverhalten der Ciliaten. Beide Einzeller verlieren ihre Fähigkeit zur gravitaktischen Orientierung in 10°C (4°C), obwohl eine Abnahme der Reversalraten (Richtungswechsel) beobachtet wurde und die Zellen somit geradliniger schwammen. Dagegen bleibt die Gravikinese, wenn auch bei *Tetrahymena* reduziert, erhalten, obwohl die mittleren Schwimmgeschwindigkeiten bei beiden Ciliaten deutlich absinken.

Tetrahymena zeigt im Vergleich mit *Paramecium* sehr viel deutlichere Veränderungen der Zellform in der Kälte, die Zellen runden sich stark ab, so dass zu vermuten ist, dass ein möglicher Bojeneffekt abgeschwächt würde. Elektronen- und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zeigten durch Kälte induzierte

Änderungen der Lipideinlagerungen in beiden Ciliaten, die bei *Tetrahymena* zunehmen, bei *Paramecium* abnehmen, aber offensichtlich nicht für den Verlust der Gravitaxis verantwortlich sind. Die Änderungen in der Lipidspeicherung könnten aber für die Zellen als Anpassung an die kälteren Temperaturen und schlechtere Lebensbedingungen ökologisch eine Rolle spielen. Da *Paramecium biaurelia* und auch *Tetrahymena pyriformis* in den kälteren Jahreszeiten keine Cysten bilden, wäre eine Schutz- und Speicherfunktion der Lipide denkbar, so wie das auch bei verschiedenen anderen niedermolekularen Stoffen bekannt ist.

Um einen Beitrag zu der Frage zu leisten, ob die sekundären Botenstoffe cAMP (zyklisches Adenosin-Monophosphat) und cGMP (zyklisches Guanosin-Monophosphat) an der Schwerereiz-Signalkette beteiligt sind, wurden, in Ergänzung zu früheren Untersuchungen an *Paramecium*, die Konzentrationen von cAMP und cGMP bei *Tetrahymena* unter veränderten Beschleunigungsbedingungen (Hypergravitation und Mikrogravitation) untersucht. Nach der Arbeitshypothese sollte cAMP als Second Messenger bei Hyperpolarisationsvorgängen in negativ gravitaktischen Ciliaten beeinflusst werden: Absinken in Mikrogravitation, Anstieg in Hypergravitation. Dagegen sollten keine Level-Änderungen bei den entsprechenden Beschleunigungsexperimenten im Hinblick auf cGMP als Second Messenger bei depolarisationsabhängigen Vorgängen auftreten. Im Gegensatz zu *Paramecium*, wo sich die postulierten Konzentrationsänderungen zeigten, sind die Ergebnisse bei *Tetrahymena* nicht eindeutig. Bei den Hypergravitationsversuchen ist bei *Tetrahymena* eine mögliche Reaktion auf den cAMP-Level aufgrund der hohen Schwankungen der Werte nicht zu belegen. Im Mikrogravitationsexperiment auf der Höhenforschungsrakete TEXUS 39 zeigt sich erst gegen Ende der Versuchszeit (nach ca. 250 s) eine Tendenz zum Absinken der cAMP-Werte. Nach verschiedenen früheren Beobachtungen wird vermutet, dass *Tetrahymena* wesentlich langsamer auf veränderte Beschleunigungswerte reagiert, so dass die gewählten Versuchszeiten unter Umständen nicht ausreichen, um die Arbeitshypothese zur Beteiligung sekundärer Botenstoffe an der Vermittlung des Schwerkraftreizes zu prüfen.

Dass bei *Tetrahymena* unter Mikrogravitationsbedingungen keine Reaktion in Bezug auf die cAMP-Konzentration (Absinken) nachzuweisen ist, ist zunächst überraschend. Die Energien, die bei der vorliegenden Restbeschleunigung in Mikrogravitation auf die Ionenkanäle wirken, sollten kleiner als die Wirkung der Brown'schen Molekularbewegung ($1,09 \times 10^{-22}$ gegenüber 2×10^{-21}) sein, so dass sie nicht mehr ausreichen dürften, um die Kanäle zu öffnen. Die Zellen sind so nicht mehr in der Lage, die Restbeschleunigung ($10^{-4}g$) wahrzunehmen. Das sollte für *Tetrahymena* wie auch für *Paramecium* der Fall sein. Da *Tetrahymena* jedoch um einiges kleiner ist als *Paramecium*, ist auch denkbar, dass die „gating“-Energien bei diesem Einzeller größer sind und *Tetrahymena* damit unempfindlicher reagiert als *Paramecium*, wodurch eine Verzögerung der Reaktion auftritt. Ebenso könnten Relaxationseffekte im cAMP-Abbau oder beteiligten Verstärkerstrukturen eine Rolle spielen.

Die kälteinduzierten Veränderungen in den Schwerkraftantworten der untersuchten Ciliaten unterstützen das Statocystenmodell der Schwerkraftwahrnehmung. Eine Unterstützung der physiologischen Prozesse durch physikalische Gegebenheiten bei der Ausprägung der Gravitaxis kann jedoch nicht ausgeschlossen werden. Vor allem die Änderungen der Zellform bei *Tetrahymena* und ihre möglichen Auswirkungen auf ihre Funktion als Boje deuten in diese Richtung. Der Größenunterschied macht den Vergleich dieser Organismen sehr interessant, da sich immer wieder Unterschiede zwischen den Reaktionen der beiden Arten auf die unterschiedlichen Kultivierungstemperaturen beobachten lassen und sich dadurch verschiedene Einblicke in den Prozess der Signalperzeption und -transduktion ergeben.

6. Literaturverzeichnis

- Baba, S. A., Tatematsu, R. & Mogami, Y. 1991. A new hypothesis concerning graviperception of single cells, and supporting simulated experiments. - Biol. Sci. Space 5: 290-291.
- Baluska, F., Kreibaum, A., Vitha, S., Parker, J.S., Barlow, P.W. & Sievers, A. 1997. Central root cap cells are depleted of endoplasmatic microtubules and actin microfilament bundles: Implications for their role as gravity-sensing statocysts. - Protoplasma 196: 212-223.
- Balzer, I. & Hardeland, R. 1991a. Circadian rhythmicity in the stimulation of bioluminescence by biogenic amines and MAO inhibitors in *Gonyaulax polyedra*. - Int. J. Biometeorol. 34: 231-234.
- Balzer, I. & Hardeland, R. 1991b. Photoperiodism and effects of indolamines in a unicellular alga, *Gonyaulax polyedra*. - Science 253: 795-797.
- Balzer, I. & Hardeland, R. 1996. Melatonin in algae and higher plants, possible new roles as a phytohormone and antioxidant. - Botanica Acta 109: 180-183.
- Batschelet, E. 1965. Statistical methods for the analysis of problems in animal orientation and certain biological rhythms. - In Animal orientation and navigation. NASA, Whashington, 61-91.
- Batschelet, E. 1981. Circular statistics in biology. Academic Press, London, New York.
- Bonini, N. M., Gustin, M. C. & Nelson, D. L. 1986. Regulation of the ciliary motility by membrane potential in *Paramecium*: a role of cyclic AMP. - Cell Motil. Cytoskel. 6: 256-272.
- Bonini, N. M. & Nelson, D. L. 1988. Differential regulation of *Paramecium* ciliary motility by cAMP and cGMP. - J. Cell Biol. 106: 1615-1623.
- Bonini, N. M., Evand, T.C., Miglietta, L.A.P. & Nelson, D. L. 1991. The regulation of ciliary motility in *Paramecium* by Ca^{2+} and cyclic nucleotides. - Adv. in Sec. Mess. and Phosphoprot. Res. 23: 227-272.
- Bräucker, R., Machemer-Röhnisch, S., Machemer, H. & Murakami, A. 1992. Gravity-controlled gliding velocity in *Loxodes*. - Eur. J. Protistol. 28: 238-245.
- Bräucker, R., Machemer-Röhnisch, S. & Machemer, H. 1994. Gravidresponses in *Paramecium caudatum* and *Didinium nasutum* examined under hypergravity conditions. - J. Exp. Biol. 197: 271-294.

- Bräucker, R., Murakami, A., Ikegaya, K., Yoshimura, K., Takahashi, K., Machemer-Röhnisch, S. & Machemer, H. 1998. Relaxation and activation of graviresponses in *Paramecium caudatum*. - J. Exp. Biol. 201, 14: 2103-2113.
- Bräucker R. & Hemmersbach R. 2002. Ciliates as model systems for cellular graviperception. - ESA-SP 501: 31-34.
- Brinkmann, K. 1968. Keine Geotaxis bei *Euglena*. - Pflanzenphysiologie 59: 12-16.
- Cachon, J. & Cachon M. 1980. Polymorphism of tubulin reassembly: I. Different aspects of allotropic transformations induced by low temperature. - Biol. Cell. 37: 23-34.
- Capdeville, Y. & Benwakrim, A. 1994. Temperature-dependent expression of ciliary GPI-proteins in *Paramecium*. - Brazilian J. Med. Biol. Res. 27: 415-420.
- Chapman-Andresen, C. 1958. Pinocytosis of inorganic salts by *Amoeba proteus* (Chaos diffluens). - C R Trav. Lab. Carlsberg 31, 6: 77-92.
- Cohen J. & Beisson, J. 1988. The cytoskeleton. - In Görtz, H.-D. 1988. *Paramecium*. Springer Verlag, Berlin-Heidelberg, 363-392.
- Connolly, J.G., Brown, I.D., Lee, A.G. & Kerkut, G.A. 1985a. The effects of temperature upon the electrophysiological properties of *Tetrahymena pyriformis* – NT1. - Comp. Biochem. Physiol. 81A, 2: 293-302.
- Connolly, J.G., Brown, I.D., Lee, A.G. & Kerkut, G.A. 1985b. Temperature-dependent changes in the swimming behaviour of *Tetrahymena pyriformis* – NT1 and their interrelationships with electrophysiology and the state of membrane lipids. - Comp. Biochem. Physiol. 81A, 2: 303-310.
- Csaba, G. 1993. Presence in and effects of pineal indolamines at very low level of phylogeny. - Experientia 49, 8: 627-634.
- Csaba, G., Nagy, S.U. & Lantos, T. 1976. Are biogenic amines acting on *Tetrahymena* through a cyclic AMP mechanism? - Acta Biol. Med. Germ. 35: 259-261.
- Csaba, G., Nagy, S.U. & Lantos, T. 1978. Cyclic AMP and its functional relationship in *Tetrahymena*: A comparison between phagocytosis and glucose uptake. - Acta Biol. Med. Germ. 37: 505-507.
- Czapeck, F. 1895. Untersuchungen zum Geotropismus. - Jahrbuch wiss. Bot. 27: 243-339.
- Dembowski, J. 1929a. Die Vertikalbewegungen von *Paramecium caudatum*. I. Lage des Gleichgewichtszentrums im Körper des Infusors. - Arch. f. Protistenk. 66: 104-132.

- Dembowski, J. 1929b. Vertikalbewegungen von *Paramecium caudatum*. II. Einfluß einiger Außenfaktoren. - Arch. f. Protistenk. 68: 215-260.
- Dembowski, J. 1931. Vertikalbewegungen von *Paramecium caudatum*. III. Polemisches und Experimentelles. - Arch. Protistenk. 73: 153-187.
- Diaspro, A. & Robello, M. 2000. Two-photon excitation of fluorescence for three-dimensional optical imaging of biological structures. - J. Photochem. Photobiol. B: 551: 1-8.
- Diehn, B., Feinleib, M., Haupt, W., Hildebrand, E., Lenci, F. & Nultsch, W. 1977. Terminology of behavioral responses of motile microorganisms. - Photochem. Photobiol. 26: 559-560.
- Dressendörfer, R. A. 1994. Synthese von Hapten-Biotin-Konjugaten und ihre Verwendung als Tracer in Immunoassays am Beispiel des Steroidhormons Cortisol und des zyklischen Nukleotids cGMP. Dissertation.
- Eckert, R. 1972. Bioelectric control of the ciliary activity. - Science 176: 473-481.
- Edmunds, Jr., L.N., Carré, I.A., Tamponnet, C. & Tong, J. 1992. The role of ions and second messengers in circadian clock function. - Chronobiology International 9, 3: 180-200.
- Elliott, A. M., Kennedy, Jr., J.R. & Bak, I.J. 1962. Macronuclear events in synchronously dividing *Tetrahymena pyriformis*. - J. Cell Biol. 12: 515-531.
- Elliott, A. M. 1973. Biology of *Tetrahymena*. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, Pennsylvania.
- Elwess, N.L. & Van Houten, J.L. 1997. Cloning and molecular analysis of the plasma membrane Ca^{2+} -ATPase gene in *Paramecium tetraurelia*. - J. Eukar. Microbiol. 44: 250-257.
- Fenchel, T. & Finlay, B. J. 1984. Geotaxis in the ciliated protozoon *Loxodes*. - J. Exp. Biol. 110: 17-33.
- Fenchel, T. & Finlay B. J. 1986. The structure and function of Müller Vesicles in loxodid ciliates. - J. Protozool. 33: 69-76.
- Freiberger, N. 1997. Einfluß der Temperatur auf die Schwerkraftantworten von Protozoen. Diplomarbeit, Bonn.
- Frowein, A. & Lapin, V. 1979. Effects of sham-pinealectomy, performed under white and red light, on the melatonin content of rat pineal glands. - Experientia 35: 1681.

Fuhrberg, B., Hardeland, R., Poeggeler, B. & Behrmann, G. 1997. Dramatic rises of melatonin and 5-methoxytryptamine in *Gonyaulax* exposed to decreased temperature. – Biol. Rhythm Res. 28: 144-150.

Fukui, K. & Asai, H. 1985. Negative geotactic behaviour of *Paramecium* is completely described by the mechanism of buoyancy-oriented upward swimming. – J. Biophys. 47: 479-482.

Gebauer M., Watzke D. & Machemer H. 1999. The gravikinetic response of *Paramecium* is based on orientation-dependent mechanotransduction. - Naturwiss. 86: 352-356.

Görtz, H.-D. 1988. *Paramecium*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg.

Greenspan, P., Mayer, E.P. & Fowler, S.D. 1985. Nile red: A selective fluorescent stain for intracellular lipid droplets. – J. Cell Biol. 100: 965-973.

Groß, M. 1997. Exzentriker des Lebens. Spektrum-Verlag, Heidelberg.

Häder D.-P., Colombetti, G., Lenci, F. & Quaglia, M. 1981. Phototaxis in the flagellates, *Euglena gracilis* and *Ochromonas danica*. - Arch. Microbiol. 130: 78-82.

Häder, D.-P. & Lebert, M. 1985. Real time computer-controlled tracking of motile microorganisms. - Photochem. Photobiol. 42: 509-514.

Häder, D.-P. & Vogel, K. 1991. Simultaneous tracking of flagellates in real time by image analysis. - J. Math. Biol. 30: 63-72.

Hardeland, R., Reiter, R.J., Poeggeler, B. & Tan, B.-X. 1993. The significance of the metabolism of the neurohormone melatonin: antioxidative protection and formation of bioactive substances. - Neuroscience and Biobehavioral Reviews 17: 347-357.

Hardeland, R., Balzer, I., Poeggeler, B., Fuhrberg, B., Uria, H., Behrmann, G., Wolf, R., Meyer, T.J. & Reiter, R.J. 1995. On the primary functions of melatonin in evolution: Mediation of photoperiodic signals in a unicell, photooxidation, and scavenging of free radicals. – J. Pineal Res. 18: 104-111.

Hardeland, R. & Fuhrberg, B. 1996. Ubiquitous melatonin - presence and effects in unicells, plants and animals. - Trends in Comp. Biochem. and Physiol. 2: 25-45.

Hardeland, R. 1999a. Melatonin and 5-methoxytryptamine in non-metazoans. - Reproduction, Nutrition, Development 39: 399-408.

Hardeland, R., Burkhardt, S., Antolin, I., Fuhrberg, B. & Coto-Montes, A. 1999b. Melatonin and 5-methoxytryptamine in the bioluminescent dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. – Adv. Exp. Med. and Biol. 460: 387-390.

Hasegawa, K., Tsukahara, Y., Shimamoto, M., Matsumoto, K., Nakaoka, Y. & Sato, T. 1997. The *Paramecium* circadian clock: Synchrony of changes in motility, membrane potential, cyclic AMP and cyclic GMP in *Paramecium*. - J. Comp. Physiol. A 181: 41-46.

Hayat, M.A. 1981. Fixation for Electron Microscopy. Academic Press, New York.

Hemmersbach, R. & Briegleb, W. 1987. Experiments concerning gravisensitivity of protozoa. - ESA SP-271: 291-294.

Hemmersbach, R., Voormanns, R. & Häder, D.-P. 1996a. Graviresponses in *Paramecium bicaurelia* under different accelerations: Studies on the ground and in space. - J. Exp. Biol. 199: 2199-2205.

Hemmersbach, R., Voormanns, R., Rabien, R., Bromeis, B. & Ivanova, K. 1996b. Graviperception and signal transduction in unicellular organisms. - ESA-SP 390: 193-197.

Hemmersbach R. 1997. Schwerkraftinduziertes Verhalten bei Protozoen und Perzeptionshypothesen. Habilitationsschrift an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

Hemmersbach R., Voormanns R., Bromeis B., Schmidt, N., Rabien H. & Ivanova K. 1997b. Comparative studies of the graviresponses of *Paramecium* and *Loxodes*. - Adv. Space Res. 21: 1285-1289.

Hemmersbach, R., Volkmann, D. & Häder, D.-P. 1999. Graviorientation in protists and plants. - J. Plant Physiology 154: 1-15.

Hemmersbach R., Bromeis B., Bräucker R., Krause M., Freiburger N., Stieber C. & Wilczek M. 2001. *Paramecium* - a model system for studying cellular graviperception. - Adv. Space. Res. 27, 5: 893-898.

Hemmersbach-Krause, R. 1988. Vergleichende Untersuchungen zur Gravitaxis und Morphologie von *Loxodes* und *Paramecium*. - Dissertation, Bonn.

Hemmersbach-Krause, R. & Häder, D.-P. 1990. Negative gravitaxis (geotaxis) of *Paramecium* demonstrated by image analysis. - Appl. Micrograv. Techn 4: 221-224.

Hemmersbach-Krause, R. & Briegleb, W. 1992. Gravitational effects on *Paramecium* and *Loxodes*. - The Physiologist 35: 3-26.

Hemmersbach-Krause, R., Briegleb, W., Häder, D.-P., Vogel, K., Grothe, D. & Meyer, I. 1993a. Orientation of *Paramecium* under the conditions of weightlessness. - J. Euk. Microbiol. 404: 439-446.

Hemmersbach-Krause, R., Briegleb, W., Vogel, K. & Häder, D.-P. 1993b. Swimming velocity of *Paramecium* under the conditions of weightlessness. - Acta Protozool. 32: 229-236.

Hemmersbach-Krause R., Briegleb W., Häder D.-P., Klein S. & Mulisch M. 1994. Protozoa as model systems for the study of cellular responses to altered gravity conditions. - Adv. Space Res. 14, 8: 49-60.

Hennessey T., Machemer H. & Nelson D.L. 1985. Injected cyclic AMP increases ciliary beat frequency in conjunction with membrane hyperpolarization. - Eur. J. Cell Biol. 36: 153-156.

Hill, D. L. 1972. The Biochemistry and Physiology of *Tetrahymena*. Academic Press, New York, London.

Hiramoto, Y. & Kamitsubo, E. 1995. Centrifuge microscope as a tool in the study of cell motility. - Int Rev. Cytol. 157: 99-128.

Holz, G.G. & Conner, R.L. 1973. The composition, metabolism, and roles of lipids in *Tetrahymena*. – In Elliott, A. M. 1973. Biology of *Tetrahymena*. Dowden, Hutchinson & Ross, Inc., Stroudsburg, Pennsylvania, 99-122.

Inoue, S., Fuseler, J., Salmon, E.D. & Ellis, G.W. 1975. - Biophys. J. 15: 725-744.

Inoue, T. & Nakaoka Y. 1990. Cold-sensitive responses in the *Paramecium* membrane. - CSAF 15: 107 - 112.

Ivanova, K., Heim, J.-M. & Gerzer, R. 1990. Kinetic characterization of atrial natriuretic factor-sensitive particulate guanylate cyclase. – Eur. J. Pharmacol. 189: 317-326.

Ivanova, K. 1997. Durchführung des cAMP Assays (FIA), modifiziert für *Paramecium*. - pers. Kommunikation.

Jennings, H.S. 1906. Behavior of the Lower Organisms. Indiana University Press, London, Bloomington.

Kanda, S. 1914. On the geotropism of *Paramecium* and *Spirostomum*. - Biol. Bull. 26: 1-24.

Kippert, F. 1996. A temperature-compensated ultradian clock of *Tetrahymena*: oscillations in respiratory activity and cell division. - Chronobiol. Int. 13, 1: 1-13.

Kippert, F. 1997. The ultradian clocks of eukaryotic microbes: Timekeeping devices displaying a homeostasis of the period. - Chronobiol. Int. 14, 5: 469-478.

Kowalewski, U. 1997. Untersuchungen zur Gravitation bei *Tetrahymena pyriformis*. Diplomarbeit, Bochum.

- Kowalewski, U., Bräucker, R. & Machemer, H. 1998. Responses of *Tetrahymena pyriformis* to the natural gravity vector. - Microgravity Sci. Technol. 11, 4: 167-172.
- Krause, M. 2003. Schwerkraftwahrnehmung des Ciliaten *Stylonychia mytilus*. Elektro- und verhaltensphysiologische Untersuchungen. – Dissertation, Universität Bonn.
- Kuriu, T., Nakaoka, Y. & Oosawa, Y. 1996. Cold-sensitive Ca^{2+} influx in *Paramecium*. - J. Membrane Biol. 154: 163-167.
- Kuroda, K., Kamiya N., Yoshimoto, Y. & Hiramoto, Y. 1986. *Paramecium* behavior during video centrifuge-microscopy. - Proc. Japan Acad 62, ser. B: 117-121.
- Kuroda, K. & Kamiya N. 1989. Propulsive force of *Paramecium* as revealed by the video centrifuge microscope. - Exp. Cell Res. 184: 268-272.
- Kuznicki, L. 1968. Behavior of *Paramecium* in the gravity field. I. Sinking of immobilized specimens. - Acta Protozool. 6: 109-117.
- Levy, M.R. & Elliott, A.M. 1968. Biochemical and ultrastructural changes in *Tetrahymena pyriformis* during starvation. - J. Protozool. 15: 208-222.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Radall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin-Phenol reagents. – J. Biol. Chem. 193: 265-275.
- Machemer, H., 1974. Frequency and directional responses in cilia to membrane potential changes in *Paramecium*. – J. Comp. Physiol. A 92: 293-316.
- Machemer, H. & de Peyer, J.E. 1977. Swimming sensory cells: electrical membrane parameters, receptor properties and motor control in ciliated protozoa. - Verh. Dt. Zool. Ges.: 86-110.
- Machemer, H. & Machemer-Röhnisch, S. 1984. Mechanical and electric correlates of mechanoreceptor activation of the ciliated tail in *Paramecium*. - J. Comp. Physiol. 154: 273-278.
- Machemer, H. 1988. Electrophysiology. - In Görtz, H.-D. 1988. *Paramecium*. Springer Verlag, Berlin, 185-211.
- Machemer, H., Machemer-Röhnisch, S., Bräucker, R. & Takahashi, K. 1991. Gravi-kinesis in *Paramecium*: theory and isolation of a physiological response to the natural gravity vector. - J. Comp. Physiol. A. 168: 1-12.
- Machemer, H. & Bräucker, R. 1992. Gravireception and graviresponses in ciliates. - Acta Protozool 31: 185-214.

Machemer, H., Bräucker, R., Murakami, A. & Yoshimura, K. 1993. Graviperception in unicellular organisms – A comparative behavioural study under short-term microgravity. - *Micrograv Sci. Techn.* 5, 4: 221-231.

Machemer, H. & Bräucker, R. 1996. Gravitaxis screened for physical mechanism using g-modulated cellular orientational behaviour. - *Microgravity Sci. Techn.* 9, 1: 2-9.

Machemer, H. & Machemer-Röhnisch, S. 1996. Is gravikinesis in *Paramecium* affected by swimming velocity? - *Eur. J. Protistol.* 32, Suppl. I: 90-93.

Machemer-Röhnisch, S., Machemer, H. & Bräucker, R. 1996. Electric-field effects on gravikinesis in *Paramecium*. - *J. Comp. Physiol. A* 179, 2: 213-226.

Majima, T., Hamasaki, T. & Arai, T. 1986. Increase in cellular cyclic GMP levels by potassium stimulation and its relation to ciliary orientation in *Paramecium*. - *Experientia* 42: 62-64.

Martinac, B. & Machemer, H. 1984. Effects of varied culturing and experimental temperature on electrical membrane properties in *Paramecium*. – *J. Exp. Biol.* 108: 179-194.

Muto, Y., Kudo, S., Nagao, S. & Nozawa, Y. 1985. Growth-dependent changes and adenylate cyclase activities in cilia and cell bodies of *Tetrahymena pyriformis*. - *Exp. Cell Res.* 159, 1: 267-271.

Nagel, U., Watzke, D., Neugebauer, D.-Ch., Machemer-Röhnisch, S., Bräucker, R. & Machemer, H. 1997. Analysis of sedimentation of immobilized cells under normal and hypergravity. – *Micrograv. Sci. Techn.* 10, 1: 42-52.

Nagel U. 1998. Mechanismen physiologischer Schwerkraftbeantwortung beim Wildtyp und einer Mutante von *Paramecium tetraurelia*. - Dissertation an der Fakultät für Biologie der Ruhr-Universität Bochum.

Naitoh, Y. & Eckert, R. 1968. Electrical properties of *Paramecium caudatum*: modification by bound and free cations. - *Zeitschrift für Vergleichende Physiologie* 61: 427-452.

Naitoh, Y. 1984. Mechanosensory transduction in protozoa. - *In* G. Colombetti & F. Lenzi 1984. *Membranes and Sensory Transduction*. Plenum Press, New York, 113-134.

Naitoh, Y. & Tominaga, T. 1992. Membrane potential responses to thermal stimulation and the control of thermoaccumulation in *Paramecium caudatum*. - *J. Exp. Biol.* 164: 39 - 53.

Nakaoka Y. & Oosawa F. 1977. Temperature-sensitive behavior of *Paramecium caudatum*. - *J. Protozool.* 24: 575 - 580.

Nakaoka Y. 1982. Behavioral adaptation of *Paramecium caudatum* to environmental temperature - the effect of cell density-. - Proc. Japan Academy, Series B, 58: 213 - 217.

Nakaoka Y. & Ooi, H. 1985. Regulation of ciliary reversal in triton-extracted *Paramecium* by calcium and cyclic adenosine monophosphate. - J. Cell Science 77: 185-195.

Nandini-Kishore, S.G. & Thompson, Jr., G.A. 1979. Increased levels of adenosine 3', 5'-cyclic monophosphate in *Tetrahymena* stimulated by glucose and mediated by Ca^{2+} and epinephrine. - Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76, 6: 2708-2711.

Nowakowska, G. & Grebecki, A. 1977. On the mechanism of orientation of *Paramecium caudatum* in the gravity field. II. Contributions to a hydrodynamic model of geotaxis. - Acta Protozool. 16: 359-376.

Nozawa, Y. & Thompson, Jr., G.A. 1979. Lipids and membrane organization in *Tetrahymena*. - Biocemistry and Physiology of Protozoa 2: 275-338.

Okamoto, K.-I. & Nakaoka, Y. 1994. Reconstruction of metachronal waves in ciliated cortical sheets of *Paramecium*. II. Asymmetry of the ciliary movement. - J. Exp. Biol. 192: 73-81.

Ooya, M., Mogami, Y., Izumi-Kurotani, A. & Baba, S. A. 1992. Gravity-induced changes in propulsion of *Paramecium caudatum*: A possible role of graviperception in protozoan behaviour. - J. Exp. Biol. 163: 153-167.

Pech, L. L. 1995. Regulation of ciliary motility in *Paramecium* by cAMP and cGMP. - Comp. Biochemistry and Physiology A 111: 31-37.

Penard E. 1917. Le genre *Loxodes*. - Rev. Suisse de Zool. 25: 453-489.

Pickard, B.G. & Thimann, K.V. 1966. Geotropic response of wheat coleoptiles in absence of amyloplast starch. - J. Genetic Physiology 49: 1063-1086.

Poeggeler, B., Balzer, I., Fischer, J., Behrmann, G. & Hardeland, R. 1989. A role of melatonin in dinoflagellates?. - Acta Endocrinologica 120 (Supplement 1): 97.

Poeggeler, B., Balzer, I., Hardeland, R. & Lerchl, A. 1991. Pineal hormone melatonin oscillates also in the dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. - Naturwissenschaften 78: 268-269.

Preston, R. R. & Saimi, Y. 1990. Calcium ions and the regulation of motility in *Paramecium*. - In R. A. Bloodgood 1990. Ciliary and Flagellar Membranes. Plenum Press, New York, 173-194.

- Ramanathan, R., Saimi, Y., Hinrichsen, R., Burgess-Cassler, A. & Kung, C. 1988. A genetic dissection of ion-channel functions. - In Görtz, H.-D. 1988. *Paramecium*. Springer-Verlag, Berlin, 236-253.
- Ramoino, P., Margallo, E. & Nicolò, G. 1996. Age-related changes in neutral lipid content of *Paramecium primaurelia* as revealed by Nile red. - J. Lipid Res. 37: 1207-1212.
- Ramoino, P., Diaspro, A., Fato, M. & Beltrame, F. 1999. Cytofluorometry and fluorescence confocal laser scanning microscopy (CLSM) in the study of neutral lipid dynamics in *Paramecium primaurelia* mating types during cell line development. - Cytometry 35: 346-352.
- Rieder, N. 1977. Die Müllerschen Körperchen von *Loxodes magnus* (Ciliata, Holotricha): Ihr Bau und ihre mögliche Funktion als Schwererezeptor. - Verh. Dt. Zool. Ges.: 254.
- Roberts, A. M. 1970. Geotaxis in motile micro-organisms. - J. Exp. Biol. 53: 687-699.
- Robinson 1985. Präparationsmethodik in der Elektronenmikroskopie. Eine Einführung für Biologen und Mediziner. Springer, Berlin, Heidelberg, 39-43.
- Roenneberg, T., Colfax, G.N. & Hastings, J. W. 1989. A circadian rhythm of population behavior in *Gonyaulax polyedra*. - J. Biological Rhythms 4, 2: 201-216.
- Rosenbaum, N., Erwin, J., Beach, D. & Holz, Jr., G.G. 1966. The induction of a phospholipid requirement and morphological abnormalities in *Tetrahymena pyriformis* by growth at supraoptimal temperature. - J. Protozool. 13, 535-546.
- Sakamoto, T., Higashi, S., Wada, H., Murata, N. & Bryant, D.A. 1997. Low-temperature-induced desaturation of fatty acids and expression of desaturase genes in the cyanobacterium *Synechococcus* sp. PCC 7002. - FEMS Microbiol. Letters 152: 313-320.
- Schmidt, N.A. 1997. Lokalisierung der Schwerkraftperzeption bei *Paramecium*. - Schriftliche Hausarbeit im Rahmen der ersten Staatsprüfung für das Lehramt (Sekundarstufe II), Bonn.
- Schultz, J.E. & Klumpp, S. 1984: Calcium/calmodulin-regulated guanylate cyclases in the ciliary membranes from *Paramecium* and *Tetrahymena*. - Adv. Cyclic Nuc. Prot. Phosphoryl. Res. 17: 275-284.
- Schultz, J. E., Pohl, T. & Klumpp, S. 1986. Voltage-gated Ca^{2+} entry into *Paramecium* linked to intraciliary increase in cyclic GMP. - Nature 322: 271 – 273.
- Schultz, J.E. & Klumpp, S. 1988. Biochemistry of cilia. - In Görtz, H.-D. 1988. *Paramecium*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 254-270.

- Schultz, J.E., Klumpp, S., Benz, R., Schürhoff-Goerts, W.J.C. & Schmid, A. 1992. Regulation of adenylyl cyclase from *Paramecium* by an intrinsic potassium conductance. - Science 255: 600-603.
- Schultz, J. E. & Schönborn, Ch. 1994. Cyclic AMP formation in *Tetrahymena pyriformis* is controlled by a K⁺-conductance. - FEBS 356: 322-326.
- Sievers, A., Buchen, B., Volkmann, D. & Hejnowicz, Z. 1991. Role of the cytoskeleton in gravity perception. - In C. W. Lloyd 1991. The Cytoskeletal Basis of Plant Growth and Form. Academic Press, London, 169-182.
- Sievers, A., Sondag, C., Trebacz, K. & Hejnowicz, Z. 1995. Gravity induced changes in intracellular potentials in statocysts of cress roots. - Planta 197: 392-398.
- Spindler, M., Dieckmann G.S. 1991. Das Meereseis als Lebensraum. - Spektrum der Wissenschaft 8, 1: 48.
- Steiner, A.L., Parker, C.W. & Kipnis, D.M. 1970. The measurement of cyclic nucleotides by radioimmunoassay. - Adv. Biochem. Psychopharmacol. 3: 89-111.
- Stieber, Ch. 2001. Einfluss von Gravitation auf cAMP und cGMP bei *Paramecium biaurelia* und *Tetrahymena pyriformis*. - Diplomarbeit, Bonn.
- Stockem, W. & Korohoda, W. 1975. Effects of induced pinocytotic activity and extreme temperature on the morphology of Golgi bodies in *Amoeba proteus*. - Cell Tissue Res. 157, 4: 541-552.
- Taneda, K., Miyata, S. & Shiota, K. 1987. Geotactic behavior in *Paramecium caudatum*. II. Geotaxis assay in a population of the specimens. - Zool. Sci. 4: 789-795.
- Tawada K. & Oosawa F. 1972. Responses of *Paramecium* to temperature change. - J. Protozool. 19: 53-57.
- Tawada K. & Miyamoto H. 1973. Sensitivity of *Paramecium* thermotaxis to temperature change. - J. Protozool. 20: 289 - 292.
- Torres, A. & Delgado, P. 1989. Effects of cold and nocodazole treatments on the microtubular systems of *Paramecium* in interphase. - J. Protozool. 36, 2: 113-119.
- Van Houten, J. & Preston, R.R. 1988. Chemokinesis. - In Görtz, H.-D. 1988. *Paramecium*. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 282-300.
- Vogel, K., Hemmersbach-Krause, R., Briegleb, W., Kühnel, C. & Häder, D.-P. 1993. Swimming behavior of the unicellular flagellate, *Euglena gracilis*, in simulated and real microgravity. - Microgravity Sci. Techn. V/4: 232-237.

Volkman, D., Buchen, B., Hejnowicz, Z., Tewinkel, M. & Sievers, A. 1991. Oriented movement of statoliths studied in a reduced gravitaional field during parabolic flights of rockets. - *Planta* 185: 153-161.

Volkman, D. & Sievers, A. 1992. Forschung unter reduzierter Schwerkraft. Teil I: Grundlagen der Gravitationsbiologie. - *Naturwissen.* 97: 68-74.

Volkman, D. & Baluška, F. 2000. Actin cytoskeleton related to gravisensing in higher plants. - *Dev. in Plant and Soil Sci.* 89: 557-572.

Walín, M. & Stromberg, E. 1995. Cold-stable and cold-adapted microtubules. - *Int. Rev. Cytol.* 157: 1-31.

Watzke D. 2000. Experimentelle Beeinflussung der gravisensorischen Transduktion bei *Paramecium caudatum*. – Dissertation, Bochum.

Wille, Jr., J.J. 1979. Biological rhythms in protozoa. - *In* M. Levandowsky & S.H. Hunter 1979. *Biochemistry and Physiology of Protozoa*, 2nd ed. Academic Press, New York, 67-149.

Winet, H. & Jahn, T.L. 1974. Geotaxis in protozoa. I. A propulsion-gravity model for *Tetrahymena* (Ciliata). - *J. Theor. Biol.* 46: 449-465.

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Aqua bidest.	aqua bidestillata (lat.), zweifach destilliertes Wasser
cAMP	zyklisches Adenosin-Monophosphat
cGMP	zyklisches Guanosin-Monophosphat
CCAP	Culture Collection of Algae and Protozoa (Catalog of Strains, 1988)
CCD	Charged Coupled Device
Δ	gravikinetischer Koeffizient nach Machemer [$\mu\text{m/s}$] (Machemer et al., 1991)
DMSO	Dimethyl Sulfoxide
TRIS	Hydroxymethyl-aminomethan
FIA	Fluoreszenz-Immuno-Assay
RIA	Radio-Immuno-Assay
g	Erdbeschleunigung [abgeleitete SI-Einheit ($1\text{g} = 9,81 \text{ m/s}^2$)
hg	Hypergravitation (= Beschleunigung $> 1\text{g}$)
μg	Mikrogravitation (= Beschleunigung $< 1\text{g}$; Größenordnung von 10^{-4}g bis 10^{-6}g)
TEXUS	Technologische Experimente unter Schwerelosigkeit
MAXUS	Super-TEXUS
N	Datenzahl (Anzahl der Zellspuren bzw. Zellen)
PCA	Perchloric acid (Perchlorsäure)
Prot	Protein
r-Wert	Maß für die Präzision der Orientierung
S	Sedimentationsgeschwindigkeit
T	Temperatur
Tab.	Tabelle
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskop
Θ	Theta = mittlerer Orientierungswinkel (bevorzugte Schwimmrichtung)
U/min	Umdrehungen pro Minute
v	Schwimmgeschwindigkeit
ν	Viskosität

Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Expositionsdauer in den Kultivierungstemperaturen	28
Tab. 2: Vergrößerungsfaktoren bei der Elektronenmikroskopie	32
Tab. 3: Fluoreszenzmikroskopie: Wellenlängenbereiche der Anregung und Emission.....	33
Tab. 4: Fixierungszeitpunkte und Beschleunigungen der Zentrifugationsversuche	37
Tab. 5: Fixierungszeitpunkte während des TEXUS 39-Experimentes.....	39

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Statocystenmodell der Graviperzeption bei <i>Paramecium</i>	11
Abb. 2: Repräsentative Zirkularhistogramme der gravitaktischen Orientierung.....	19
Abb. 3: Verteilung immobilisierter Zellen nach der Zentrifugation im Medium	30
Abb. 4: Schemata der vermessenen Formfaktoren.....	31
Abb. 5 a – c: Aufbau des Texusmoduls	40
Abb. 6: Präzision der Orientierung (r-Wert) bei <i>Tetrahymena</i>	47
Abb. 7: Präzision der Orientierung (r-Wert) bei <i>Paramecium biaurelia</i>	47
Abb. 8: Aufwärts- und Abwärtsschwimmgeschwindigkeiten (v) von <i>Tetrahymena</i>	49
Abb. 9: Aufwärts- und Abwärtsschwimmgeschwindigkeiten (v) von <i>Paramecium</i>	49
Abb. 10: Gravikinetische Komponente Δ bei <i>Tetrahymena</i>	51
Abb. 11: Gravikinetische Komponente Δ bei <i>Paramecium</i>	51
Abb. 12: Reversalfrequenz von <i>Paramecium</i>	53
Abb. 13: Reversalfrequenz von <i>Tetrahymena</i>	53
Abb. 14: Viskosität der beiden Kulturmedien im Vergleich zu Wasser	54
Abb. 15: Elektronenmikroskopie - <i>Tetrahymena pyriformis</i> bei 20°C.	58
Abb. 16: Elektronenmikroskopie - <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach drei Tagen bei 10°C	58
Abb. 17: Elektronenmikroskopie - <i>Tetrahymena pyriformis</i> nach 40 Tagen bei 10°C	58
Abb. 18: Elektronenmikroskopie - <i>Paramecium biaurelia</i> bei 20°C.....	59
Abb. 19: Elektronenmikroskopie - <i>Paramecium biaurelia</i> bei 10°C.....	59
Abb. 20: Fluoreszenzmikroskopie - Lipideinlagerung bei <i>Tetrahymena</i> in 20°C	60
Abb. 21: Fluoreszenzmikroskopie - <i>Tetrahymena</i> nach drei Tagen bei 10°C.	60
Abb. 22: Fluoreszenzmikroskopie - <i>Tetrahymena</i> nach 40 Tagen bei 10°C.	60
Abb. 23: Fluoreszenzmikroskopie - <i>Paramecium</i> bei 20°C.....	61
Abb. 24: Fluoreszenzmikroskopie - <i>Paramecium</i> bei 10°C.....	61
Abb. 25a: Achsenverhältnis (Längsachse/Querachse) von <i>Paramecium</i>	64
Abb. 25b: Schnittflächen von <i>Paramecium</i>	64
Abb. 25c: Verhältnis von Fläche zu Längsachse ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) der <i>Paramecium</i> -Zellen	64
Abb. 26a: Achsenverhältnis (Längs- zu Querachse) von <i>Tetrahymena</i>	67
Abb. 26b: Flächenänderung von <i>Tetrahymena</i> -Zellen	67
Abb. 26c: Verhältnis von Fläche zu Längsachse ($\mu\text{m}^2/\mu\text{m}$) der <i>Tetrahymena</i> -Zellen	67
Abb. 27a: 5`Methoxy-Tryptamin-Konzentrationen bei <i>Paramecium</i>	69
Abb. 27b: Melatonin-Konzentrationen bei <i>Paramecium</i>	69
Abb. 27c: 5`Methoxy-Tryptamin-Konzentrationen in <i>Tetrahymena</i> -Kulturen.....	71
Abb. 27d: Melatonin-Konzentrationen bei <i>Tetrahymena</i>	71
Abb. 28a: cAMP-Konzentration von <i>Tetrahymena</i> während der Zentrifugation (3g).....	74
Abb. 28b: cAMP-Konzentration von <i>Tetrahymena</i> während der Zentrifugation (5g).....	74
Abb. 28c: cAMP-Konzentration von <i>Tetrahymena</i> während der Zentrifugation (9g)	74
Abb. 29a: cAMP-Konzentration bei <i>Tetrahymena</i> während des TEXUS 39-Fluges	77
Abb. 29b: cAMP-Konzentration während des TEXUS 39-Fluges bei <i>Paramecium</i> (modifiziert nach C. Stieber, 2001).....	77

Danksagung

Frau PD Dr. R. Hemmersbach danke ich für ihre Unterstützung, ihre Geduld und die vielen Anregungen im Laufe meiner Arbeit.

Herrn Prof. D. Volkmann danke ich für seine Unterstützung und die Möglichkeit die technischen Einrichtungen des Botanischen Instituts in Bonn zu nutzen.

Frau PD Dr. I. Balzer danke ich herzlich für die Bereitstellung der HPLC Anlage, die ausführliche Einarbeitung, anregende Diskussionen über Melatonin und die Möglichkeit in Göttingen zu Arbeiten.

Frau Dr. M. Mulisch danke ich für die Einführung in die Elektronenmikroskopie, die Möglichkeit am Zoologischen Institut in Köln zu arbeiten , ihr offenes Ohr und ihre Hilfe bei der Zählung der Einzeller.

Herrn Prof. Dr. G. Gerzer danke ich für die Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Luft- und Raumfahrtmedizin des DLR in Köln.

Der Wernher von Braun-Stiftung, Berlin, danke ich für die finanzielle Unterstützung bei der Arbeit an meiner Dissertation.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei allen Kollegen im DLR für ihre Hilfen im Labor, bei der Computerzählung, zahlreiche Anregungen und die vielen guten Diskussionen bedanken.

Lebenslauf

Geburtsdatum : 1970

Geburtsort : Eschweiler Rhl

Schulbildung

1976 - 1980 Katholische Grundschule Grüngürtel, Düren
 1980 - 1989 Gymnasium am Wirteltor, Düren
 1989 Abitur

Studium

1991 - 1998 Studium der Biologie an der
 Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

1993 Vordiplom

10.96 - 02.97 studentische Hilfskraft im Institut für Luft- und
 und 10.97 Raumfahrtmedizin der DLR im Rahmen einer ESA-Studie (RWTH
 Aachen)

Januar 1998 Studienabschluß Diplom, Biologie
 Prüfungsfächer: Botanik (Prof. Dr. Volkmann)
 Genetik (PD Dr. Traub)
 Meteorologie (Prof. Dr. Simmer)
 Titel der Diplomarbeit: Einfluß der Temperatur auf die
 Schwerkraftantworten von Protozoen

1998 - 2004 Promotion
 1. Referent: Prof. Dr. D. Volkmann (Botanik)
 2. Referentin: PD Dr. R. Hemmersbach (Zoologie)
 Titel der Dissertation: Verhalten, Morphologie und Physiologie
 von *Paramecium biaurelia* und *Tetrahymena pyriformis* unter
 variablen Umweltbedingungen

12.97 - 11.99 Stipendium der Wernher von Braun-Stiftung, Berlin

Tätigkeiten

1989 - 1991	Arbeit bei Dr. Baumann, Kieferorthopäde, als Hilfe in der Verwaltung, an der Rezeption und bei der Abrechnung
02.00 – 05.00	wissenschaftliche Hilfskraft im Rahmen des Projekts GRACIL (Universität Bonn)
07.00 – 12.00	wissenschaftliche Hilfskraft im Rahmen des Projekts „Spritzensystem“ (Universität Bonn)
01.01 – 09.01	wissenschaftliche Mitarbeiterin im Rahmen der Höhenforschungskampagne TEXUS 39 (DLR Köln)
10.01 – 03.02	Teamassistentin zur Datenerfassung in der Ausländerstelle des Arbeitsamtes (Bonn)
04.02 – 11.02	Aushilfsangestellte im Referat für Presse- und Öffentlichkeitsarbeit der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG)
12.02 – 12.04	Referentin im Referat für Presse- und Öffentlichkeitsarbeit der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) (Internetredaktion)

Auslandsaufenthalte

09.98	Teilnahme an der ERASMUS-Sommerschule zum Thema „Biology in Space“ und Kooperation mit Prof. Marthy am Laboratoire Arago, Banyuls sur mer, Frankreich
04.01 – 05.01	leitende Wissenschaftlerin vor Ort in Kiruna (Schweden) für ein Experiment im Rahmen der Höhenforschungskampagne Texus 39 (DLR Köln)